Untersuchungen über die Sexualität und Entwicklung von Chlorophyceen

Mit 8 Abbildungen im Text und 13 Tabellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Franz Moewus
aus Berlin-Spandau

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 2. 1933
Tag der Promotion: 31. 5. 1933

1933

343

Untersuchungen über die Sexualität und Entwicklung von Chlorophyceen

Mit 8 Abbildungen im Text und 13 Tabellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Franz Moewus
aus Berlin-Spandau

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 2. 1933
Tag der Promotion: 31. 5. 1933

1933

Referenten: Prof. Dr. M. Hartmann

Prof. Dr. K. Noack

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus dem
Archiv für Protistenkunde
Bd. 80 1933
Herausgegeben von M. Hartmann in Berlin-Dahlem und A. Pascher in Prag
Verlag von Gustav Fischer, Jena

I. Einleitung.

In den letzten Jahren ist durch die Untersuchungen von Schreiber (1925), Schulze (1927), Strehlow (1929), Hartmann (1929) und Föyn (1929) bei einigen Chlorophyceen phänotypische oder genotypische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen worden. Während bei getrenntgeschlechtlichen Algen mit genotypischer Geschlechtsbestimmung die Bipolarität der Geschlechter deutlich hervortritt und allgemein anerkannt wird, sind dagegen bei gemischtgeschlechtlichen Formen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung in letzter Zeit von verschiedenen Forschern, Czurda (1930, 1931), Kusano (1930), Mainx (1931) und Pascher (1931) Zweifel geäußert worden, die zum Teil zu einer völligen Ablehnung der Bipolarität geführt haben. Durch Aufstellung einer reizphysiologischen „Deutung" (Chemotaxis), welche sich auf die bei der Gruppenbildung der Gameten auftretenden Erscheinungen stützt, haben Mainx und Pascher versucht, ihre Anschauungen über Sexualität wahrscheinlicher zu machen, ohne bisher einen sicheren Beweis erbringen zu können. Darin stehen sie im Widerspruch zu der von Hartmann vertretenen Sexualitätshypothese. Nach Hartmann (1929) ist „die Sexualität (d. h. der Gegensatz von ‚männlich' und ‚weiblich') unbedingt und von Anfang an mit jeder Befruchtung verbunden". Wenn kein morphologischer Unterschied der beiden Geschlechter vorhanden ist, dann besteht zumindestens eine physiologische Verschiedenheit der Gameten bzw. der Gameten-

kerne. Im Falle morphologischer Isogamie äußert sich bei genotypischer Geschlechtertrennung die physiologische Geschlechtsverschiedenheit darin, daß bei der Reduktionsteilung immer zwei verschiedene Geschlechter auftreten. So unterscheiden sich z. B. bei *Gonium* nach Schreiber (1925) die vegetativen Kolonien und auch die daraus hervorgehenden Gameten beider Geschlechter in keinem morphologischen Merkmal; aber es gehen aus einer Kolonie immer nur Gameten eines bestimmten Geschlechtes hervor, die nur mit Gameten aus einer anderen Kolonie kopulieren können, die das entgegengesetzte Geschlecht haben.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Fragen an einer getrenntgeschlechtlichen Form mit genotypischer Geschlechtsbestimmung, *Chlamydomonas eugametos*, und an zwei gemischtgeschlechtlichen Arten mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung, *Stephanosphaera pluvialis* und *Protosiphon botryoides*, untersucht. Es handelt sich darum, ob entscheidende Beweise für die Bipolarität gefunden werden können.

II. *Chlamydomonas eugametos:* Eine heterözische Volvocale mit genotypischer Geschlechtsbestimmung.

Bei der Beschreibung von *Chlamydomonas eugametos* Moewus (1931) ist bereits kurz mitgeteilt worden, daß bei dieser Art die geschlechtliche Fortpflanzung beobachtet werden konnte. Im folgenden werden die Kopulationsbedingungen, der Kopulationsverlauf, die Geschlechtsdifferenzierung und Beobachtungen über Gruppenbildung und Geschlechtsstoffe zur Darstellung gelangen. Die Zell- und Kernteilung, die Physiologie der Zygotenkeimung werden in einer besonderen Arbeit mit anderen Volvocalen behandelt werden. Die Variabilität der vegetativen Zellen wird im Zusammenhang mit anderen Arten gesondert besprochen werden.

Chlamydomonas eugametos läßt sich in allen gebräuchlichen Nährmedien sehr gut kultivieren, in Peptonfaulkulturen, in Kolkwitz-, Benecke-, Knop-Nährlösung (0,01—1 Proz.), in *Volvox*-Lösung; näheres hierüber ist im Abschnitt „Kopulationsbedingungen" zu finden.

1. Kopulationsverlauf.

Zu Beginn der Kopulation berühren sich zwei Gameten mit den Vorderenden und verschlingen sich mit ihren Geißeln (Fig. 1 a, b). Im Umherschwimmen stoßen sie mehrmals aufeinander ein. Oft kommen sie zur Ruhe, besonders dann, wenn sie zu Gruppen vereinigt sind. Dabei setzt sich der eine Gamet fest; der andere freie

Gamet stößt lebhaft auf den festsitzenden ein, der seinerseits wieder beweglich werden kann und auf den inzwischen unbeweglich gewordenen anderen Gameten zustößt. Nach kurzer Zeit ist zwischen den vorderen Enden eine Plasmaverbindung hergestellt. Ähnliche bei der Kopulation von Gameten auftretende Plasmafortsätze haben Strehlow (1929) bei *Polytoma uvella* und Korschikoff (1927) bei *Phyllocardium complanatum* und bei *Chlamydomonas proboscigera* in Pascher (1927) abgebildet.

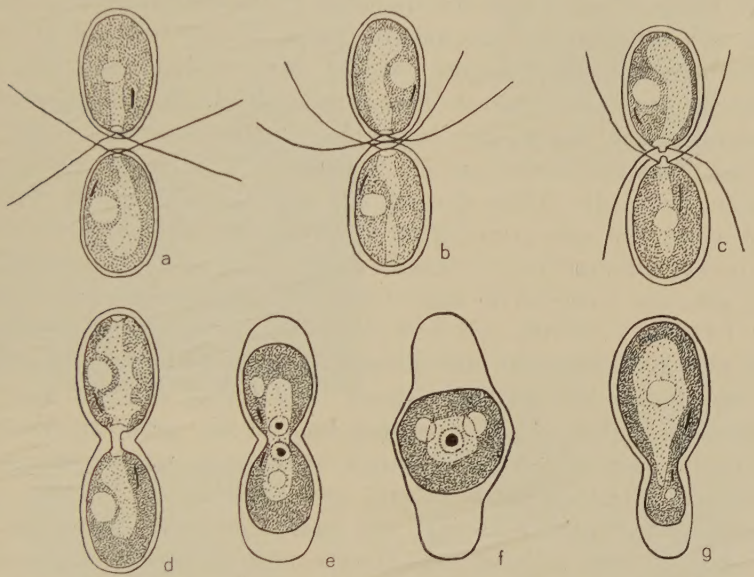

Fig. 1 a—g. *Chlamydomonas eugametos.* Kopulationsverlauf. a Verschlingen der Geißeln. b Berühren der Vorderenden. c Auseinanderplatzen der Membranen und Hervorstülpen der Plasmapapille. d Verschmelzen der Membran und der Plasmapapillen, Verlust der Geißeln. e Abheben der Protoplasten von den hinteren Enden. f Abrundung der Zygote. g „Anisogamie". (Vergr. 1400 ×.)

Ob die Membran an den Vorderenden auseinanderplatzt oder ob sie aufgelöst wird, kann nicht sicher entschieden werden. Folgende Beobachtungen machen die Auflösung wahrscheinlicher. Die Geißeln treten bei dieser Art, die meist keine Membranpapille besitzt, in einiger Entfernung voneinander aus der Membran heraus. Nachdem sich die Geißeln miteinander verflochten haben, sieht man nach dem Aufeinanderstoßen an dem Vorderende eines jeden Gameten eine Plasmapapille hervortreten (Fig. 1 c), aus deren Basis die beiden Geißeln kommen. Wenn die Membranstücke zwischen den Geißeln nicht aufgelöst werden, dann müßten sie neben der Papille sichtbar

sein. Es ist aber in dem Raum zwischen den Geißeln niemals ein Membranrest zu beobachten. Erst außerhalb des „Geißelvierecks" ist die Membran erkennbar. Die beiden vorgestülpten Plasmapapillen berühren sich und bilden einen zunächst dünnen Plasmastrang zwischen den beiden Gameten (Fig. 1 d), der allmählich dicker wird. In diesem Zustand bewegen sich die Paare bis zu 24 Stunden umher. Dann erst beginnt die weitere Verschmelzung. Die Membranen der Gameten verkleben miteinander und bilden um die Protoplasten ein festes Gehäuse. Sind nun die Gameten gleich oder annähernd gleich groß, so entfernen sich die Inhalte beider Zellen von den hinteren Enden (Fig. 1 e). Die Zygote entsteht dann in der Mitte (Fig. 1 f). Während der Abrundung der Protoplasten dehnen sich die Gametenmembranen sehr stark; der Inhalt der Zygote nimmt an Größe zu. In dem Augenblick, in dem die Zygote die warzige Membran ausscheidet, wird die Hülle, die von den Gametenmembranen gebildet wird, gesprengt und zwar findet dieser Zerfall an der Stelle statt, an der sie miteinander verschmolzen sind. Ebenso oft unterscheiden sich aber die Gameten in ihrer Größe beträchtlich, so können sich ihre Längen verhalten wie 2 : 1 (Fig. 1 g). In solchen Fällen hebt sich nur der Protoplast der kleinen Zellen vom hinteren Ende ab und wandert in den größeren hinein. Die Zygote entsteht dann im größeren Gameten. Um zu entscheiden, ob die größeren Gameten nur einem oder beiden Geschlechtern angehörten, wurden von jedem Geschlecht 20 große (ca. 15 μ lang) und 20 kleine (ca. 7 μ lang, d. h. junge Zellen) Gameten isoliert und dann die großen des einen mit den kleinen des anderen Geschlechts und umgekehrt zusammengegeben. Es fanden jedesmal Kopulationen statt; es wandert immer der kleinere Gamet in den größeren hinein, gleichgültig, welchem Geschlecht der größere angehört. Es besteht also kein morphologischer Geschlechtsunterschied. (Es können auch kleine Gameten mit kleinen und große mit großen kopulieren). Über das Verhalten der kontraktilen Vakuolen, der Chromatophoren und der Augenflecke kann nichts gesagt werden, da die Zygotenmembran keine Einzelheiten erkennen läßt. Die beiden Pyrenoide sind jedoch stets zu sehen. Selten tritt eine Pyrenoidvermehrung ein. Es können dann bis zu 10 Pyrenoide in der Zygote gezählt werden. Jedoch wurden die Bedingungen hierfür nicht analysiert. Die umherschwimmenden Paare sind immer zweikernig; wenn sie zur Ruhe gekommen sind, verschmelzen die Kerne. Aber erst 1—2 Wochen nach der Kernverschmelzung wird bei Zimmertemperatur die warzige Zygotenmembran ausgeschieden, bei Temperaturen zwischen 4 und 10° nach

3—4 Wochen. Die Zygoten sind meist kugelig, manchmal auch ellipsoidisch oder unregelmäßig geformt. Die Form hängt von der Gestalt des Protoplasten ab, der gerade bei der Membranausscheidung vorhanden ist. Da die Gametenmembranen sich mitunter sehr wenig

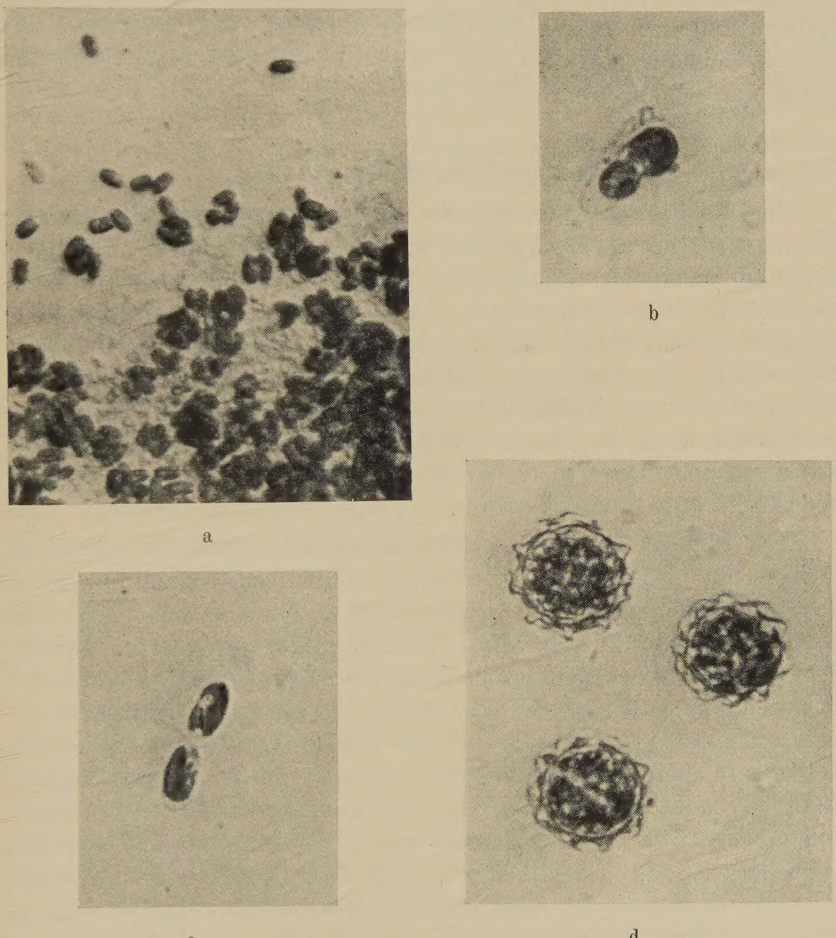

Fig. 2a—d. *Chlamydomonas eugametos.* Phot. Ufa. a Zellen auf Agar mit Nährlösung, die unteren Zellen beweglich. b Kopulationspaar. c Verschmelzen der Gameten. d Zygoten. (Vergr. bei a 400 ×, b—d 800 ×.)

dehnen, kommen dadurch ellipsoidische, und wenn die Gameten verschieden groß sind, anders geformte Zygoten zustande. Fig. 2a—d zeigt Mikrophotos von der Kopulation, der Verschmelzung und der Zygote.

Trotzdem Millionen von Kopulationen beobachtet wurden, konnte die Vereinigung von drei und mehr Gameten nicht festgestellt werden.

Die Zygoten behalten die grüne Farbe und sterben beim Austrocknen ab, wie bei *Chlamydomonas media* nach Klebs (1896). Die Keimung gelang nur nach Einwirken von Temperaturen von -5^0 bis -7^0. Danach wurde irgendeine Nährlösung hinzugegeben. Bei der Keimung werden 4, 8, 16 oder 32 Keimzellen gebildet. In den meisten Fällen entstehen vier oder acht Zellen. Die Membran quillt bei der Keimung stark auf und reißt schließlich an einer Stelle ein, durch die dann die Keimzellen frei werden.

2. Kopulationsbedingungen.

Die Keimzellen einer Zygote können sofort nach ihrem Freiwerden kopulieren. Es wurden Zygoten mit 32 Keimzellen isoliert; nach Zerreißen der Membran verlassen die Zellen die Hülle und kopulieren. Jede Keimzelle ist unter den bei der Keimung herrschenden Bedingungen Gamet. Hartmann (1914) hat eine ähnliche Erscheinung bei *Stephanosphaera pluvialis* beobachtet; die erste aus der Zygote hervorgehende Kolonie bildete sofort wieder die charakteristischen Gameten. Klebs (1892) hat bei *Vaucheria* gefunden, daß aus der keimenden Zygote der erste Faden sofort wieder Oogonien und Antheridien entwickelt hat.

Um Kopulationen zu erhalten, überträgt man Zellen von Agar in irgendeine Nährlösung. Die Zellen werden sehr schnell beweglich und beginnen dann sofort zu kopulieren. Es findet in der Flüssigkeit keine Teilung mehr statt, sondern jede von Agar in Wasser gebrachte Zelle ist kopulationsfähig, wenn sie beweglich geworden ist. Werden unbewegliche Zellen auf Agar ohne Flüssigkeit zusammengebracht, so treten niemals Zygoten auf, auch wenn die Zellen mit einer Platinnadel gut vermischt werden. Mikroskopisch kann oft beobachtet werden, daß sich zwei Zellen mit den Vorderenden berührt haben. Aus der Beschreibung des Kopulationsverlaufes ging hervor, daß wahrscheinlich durch das Aufeinanderstoßen der Gameten zu Beginn der Kopulation die Membranen aufgelöst werden. Dann erst kann die weitere Verschmelzung vor sich gehen. Dieses Aufeinanderstoßen wird erst durch das Vorhandensein der Geißeln ermöglicht.

Da also die Beweglichkeit für die Gameten notwendig erscheint, wurden die Bedingungen festgestellt, unter denen die Zellen beweglich sind oder beweglich werden. Um unbewegliche Zellen wieder beweglich zu machen, kann man Agarmaterial oder in Nährlösungen unbeweglich gewordene Zellen verwenden, ohne daß sich Unter-

schiede zeigen. Vom Alter oder Zustand der Kulturen hängt das Beweglichwerden unbeweglicher Zellen nicht ab. Denn das Zellmaterial, das von einige Tage alten Agarplatten oder von 6 Monate alten stammt oder aus einer 1 Jahr alten Flüssigkeitskultur, in der die Zellen schon mehr als 10 Monate unbeweglich sind, wird nach Überführen in irgendeine frische Nährlösung gleich gut beweglich, trotzdem die Zellen sich in den alten Kulturen schon monatelang nicht mehr geteilt haben und auch stark degeneriert aussehen. Damit die Zellen beweglich werden, brauchen sie ein Minimum von Nährstoffen. So genügt eine 0,01 proz. Knop-Lösung. Erdabkochung in einer Verdünnung 1 : 50 ist noch ausreichend, bei 1 : 100 bleiben dagegen die Zellen unbeweglich. Überführung in destilliertes Wasser oder in Leitungswasser bringt die Zellen nicht zum Schwärmen. Es gelingt aber in diesen Medien, wenn die Zellen in der Flüssigkeit einige Zeit stark geschüttelt werden. Durch den Schüttelreiz werden sie zwar beweglich, aber bereits nach 30 Minuten sind die Zellen wieder zur Ruhe gekommen. Im Dunkeln werden die Zellen nicht beweglich, auch wenn ihnen genügend Nährlösung geboten wird. Werden sie dagegen im Dunkeln in eine 1 proz. Zuckerlösung gebracht, so beginnen sie bald darauf umherzuschwimmen. Die Zellen sind beweglich innerhalb eines Temperaturbereiches von + 4 bis 36°. Endlich wurde noch der Einfluß des p_H auf die Beweglichkeit untersucht. Dazu wurde Erdabkochung mit H_2SO_4 bzw. NaOH versetzt. Mit Hilfe der Indikatoren nach Michaelis wurde dann das p_H bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte: 3,0 4,5 5,0 5,8 6,6 7,0 7,5 8,3 9,0 10,4. Erdabkochung selbst hat ein p_H von 7,0. Die Zellen werden beweglich bei einem p_H von 4,5—9,0. Bei p_H 3,0 und 10,4 bleiben die Zellen unbeweglich und sterben ab. Die Dauer der Beweglichkeit ist in den einzelnen Nährmedien bei Zimmertemperatur verschieden. In Knop-, Benecke-, Kolkwitz- und *Volvox*-lösung bleiben die Zellen 2—3 Wochen beweglich, in Peptonfaulkulturen und in Zuckerlösungen 5—6 Wochen.

In diesen Temperatur- und p_H-Bereichen und oberhalb eines Nährstoffminimums, in denen die Zellen beweglich sind, kopulieren sie auch miteinander, vorausgesetzt, daß sie belichtet werden. Im Dunkeln werden die Zellen zwar in 1 proz. Zuckerlösung beweglich, aber sie kopulieren nicht miteinander; im Licht finden in dieser Lösung Kopulationen statt. Eine kopulationshemmende Wirkung von Kohlendioxyd konnte nicht festgestellt werden. Auch kopulieren die 6 Wochen lang in Peptonfaulkulturen beweglich gewesenen Zellen ebensogut wie die gerade aus dem unbeweglichen Zustand in den

beweglichen überführten. In gleicher Weise wirkt auch das Alter der Kulturen nicht kopulationshemmend. Zellen aus Kulturen, die 1 Jahr lang nicht übergeimpft worden sind, kopulieren, nachdem sie in neuer Nährlösung beweglich geworden sind, ebensogut wie Zellen aus jungen Kulturen. Zellen, die $1^1/_2$ Jahre lang in Peptonfaulkulturen im beweglicheu Zustand kultiviert worden sind, kopulieren nach dieser Zeit trotz der langen vegetativen Vermehrung sehr gut. Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Zellen im Licht kopulieren, unter allen Bedingungen, die ihre Beweglichkeit im Licht ermöglichen. Alle Versuche sind mit absoluten Reinkulturen ausgeführt worden.

Innerhalb der Bedingungen, in denen die Zellen beweglich sind, können sie sich durch Teilung vermehren. Die Zelleu teilen sich in vier oder acht Tochterzellen. Die Teilung findet nur im unbeweglichen Zustand statt. In Flüssigkeitskulturen kommen die Zellen kurz vor der Teilung zur Ruhe; darauf finden die Teilungen statt. Die jungen Tochterzellen erhalten innerhalb der Mutterhülle die Geißeln und werden durch Aufreißen der Membran frei. Zellteilungen finden nun im Licht wie im Dunkeln statt, nur erfolgen bei regelmäßigem 12 stündigem Wechsel von Licht und Dunkelheit im Dunkeln mehr Teilungen als im Licht. Werden dagegen nach 12 stündiger Belichtung die Zellen länger als 48 Stunden im Dunkeln gelassen, so hören alle Teilungen auf.

Die Bedingungen, unter denen sich die Zellen durch Teilung vermehren können, sind: Temperaturen von 4—35°. Unter $+4^0$ finden keine Teilungen mehr statt, bei 0^0 sterben die Zellen ab. Über 35^0 hören die Teilungen auf, bei 38^0 gehen sie zugrunde. Innerhalb des p_H-Bereiches von 4,5 und 9,0 vermehrt sich die Chlamydomonade durch Teilung, oberhalb und unterhalb dieser Werte nicht mehr. Es gibt ferner eine minimale Nährlösungskonzentration; sie liegt zwischen einer Verdünnung von Erdabkochung 1 : 50 und 1 : 100. Bei 1 : 50 finden noch Teilungen statt, bei 1 : 100 nicht mehr. Die für diese Versuche verwendeten Zellen haben bereits vier Tochterzellen gebildet, die noch in der Mutterhülle eingeschlossen sind. Werden solche Zellen in eine Erdabkochung 1 : 50 gebracht, so zerfallen sie in vier Schwärmer, die umherschwimmen, heranwachsen und sich wieder teilen. Die nächste Teilung wurde noch mikroskopisch verfolgt. Nach einigen Wochen war die Kulturflüssigkeit schwach grün gefärbt, ein Zeichen dafür, daß noch eine gute Vermehrung stattgefunden haben muß. In einer Verdünnung 1 : 100 sind dagegen keine Teilungen zu beobachen. Die Grenzkonzentration

muß also zwischen 1 : 100 und 1 : 50 liegen. Die anderen Bedingungen (Licht, Temperatur, p_H) sind bei diesen Versuchen konstant gehalten worden. In maximaler Nährsalzkonzentration wurde die Entwicklung nicht untersucht. In 1 proz. Kolkwitz-Nährlösung vermehrt sich die Alge noch sehr gut. Endlich ist das Licht unbedingt notwendig. Nach länger als 48 Stunden dauernder Verdunkelung finden keine Teilungen mehr statt, auch nicht in 1 proz. Zuckerlösung. Es wird natürlich, wie auch bei den Kopulations- und Beweglichkeitsbedingungen, ein Minimum und ein Maximum der Lichtintensität geben, bei dem gerade noch Teilungen stattfinden. Untersuchungen hierüber wurden nicht angestellt.

Später wird gezeigt werden, daß die Zellen nur dann kopulieren, wenn sie einen „Geschlechtsstoff" ausscheiden. Die Bedingungen für die Bildung der „Geschlechtsstoffe" sind die Kopulationsbedingungen: Diese sind das Licht und die Bedingungen für die Beweglichkeit. Während bei den meisten Formen erst unter besonderen Bedingungen Gameten gebildet werden müssen, ist das bei *Chlamydomonas eugametos* nicht der Fall: Hier ist jede lebende Zelle Gamet.

Von anderen *Chlamydomonas*-Arten ist über Kopulationsbedingungen nicht viel bekannt. So klar wie bei *Chlamydomonas eugametos* liegen die Verhältnisse nirgends. Klebs (1896) fand bei *Chlamydomonas media*, daß im Dunkeln niemals Kopulationen erfolgen; auch nicht in Zuckerlösungen. Kopulationen kann man bei dieser Art nur auslösen, wenn Nährsalzmangel herrscht. So wirkt schon eine Konzentration von 0,05 Proz. hemmend. Nach einer Kultur von 4—5 Wochen in Nährlösung verlieren die Zellen die Neigung zur Gametenbildung. Die Gameten dieser Art kopulieren innerhalb eines Temperaturbereiches zwischen $+2^0$ und 20^0; das Optimum liegt bei $+15^0$. Bei *Chlamydomonas monoica* ist nach Strehlow (1929) die Überführung in destilliertes Wasser notwendig, ebenso bei den *Chlorogonium*-Arten und *Stephanosphaera pluvialis*. Andere Arten müssen dagegen gut ernährt werden, um Kopulationen zu bekommen, so bei *Chlamydomonas paradoxa* und bei *Chlamydobotrys*-Arten nach Strehlow (1929) und bei *Chlamydomonas pseudoparadoxa* nach eigenen Beobachtungen. Bei *Polytoma uvella* ist außerdem noch reichliche Sauerstoffzufuhr nötig. Bei keiner Form wurden aber die Bedingungen genau analysiert.

3. Geschlechtsdifferenzierung.

Von dem Material, das im Freien gesammelt worden ist, wurden im April 1929 fünf Klone isoliert. Seit dieser Zeit wurde diese Art 3 Jahre lang nur vegetativ vermehrt, ohne daß die Kopulations-

fähigkeit dadurch herabgesetzt wäre. Die Zellen eines Klones kopulieren nicht miteinander. Durch Kombinationen der fünf Klone untereinander zeigt sich, daß *Chlamydomonas eugametos* getrenntgeschlechtlich ist. Wie aus Tabelle 1 zu sehen ist, gehören die

Tabelle 1.

Chlamydomonas eugametos. Kombination von fünf Klonen, die aus Freilandmaterial isoliert worden sind: 3 (+) und 2 (—).

	a	d	e	b	c
a	—	—	—	+	+
d	—	—	—	+	+
e	—	—	—	+	+
b	+	+	+	—	—
c	+	+	+	—	—

Klone a, d, e dem einen, b und c dem anderen Geschlecht an. Um zu entscheiden, ob phänotypische oder genotypische Geschlechtsbestimmung vorliegt, wurden 15mal die vier Keimzellen einer Zygote isoliert. Nachdem die Kulturen angewachsen waren, wurden sie untereinander und mit zwei geschlechtsverschiedenen Ausgangsstämmen kombiniert. Nebenstehende Tabelle 2 gibt einen der 15 Versuche wieder. Hier gehören K2 und K3 zu dem einen Ge-

Tabelle 2.

Chlamydomonas eugametos. Kombination der vier Klone von Zygotenkeimlingen untereinander und mit den beiden Ausgangsstämmen: 2 (+) und 2 (—).

	(+)	(—)	K1	K2	K3	K4
(+)			+	+	—	—
(—)			—	—	+	+
K1	+	—	—	—	+	+
K2	+	—	—	—	+	+
K3	—	+	+	+	—	—
K4	—	+	+	+	—	—

schlecht, K1 und K4 dem anderen. Einmal konnten von acht Keimzellen sieben zur Weiterentwicklung gebracht werden; die spätere Prüfung ergab, daß drei von ihnen dem einen, vier dem anderen Geschlecht angehörten. Es konnte auch beobachtet werden, daß nach dem Freiwerden von 16 Keimzellen sich in der feuchten Kammer nach kurzer Zeit wieder acht Paare gebildet haben; von den 16 Keimzellen müssen also die eine Hälfte dem einen, die andere Hälfte dem anderen Geschlecht angehört haben. Die Geschlechtsbestimmung bei *Chlamydomonas eugametos* ist also genotypisch.

Schreiber (1925) hat gefunden, daß bei *Gonium pectorale* die Geschlechtsbestimmung genotypisch erfolgt. In der aus der Zygote hervorgehenden vierzelligen Primärkolonie gehören zwei Zellen dem einen, zwei dem anderen Geschlecht an. Schulze (1927) hat bei *Chlorogonium euchlorum* genotypische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen. Aus den Tatsachen, daß bei der Zygotenkeimung die Aufspaltung der Geschlechter erfolgt, muß geschlossen werden, daß bei der Keimung die Reduktionsteilung eintritt, wenn auch der cytologische Nachweis bisher nicht erbracht worden ist. Die Abbildungen von Zimmermann (1921) an *Volvox* sind nicht überzeugend. Auch durch die *Chlamydomonas*-Kreuzungen von Pascher (1916) ist es wahrscheinlich, daß die Reduktionsteilung bei der Zygotenkeimung erfolgt. Die Existenz diploider Volvocalen, die Pascher (1927) für wahrscheinlich hält, ist bisher nicht bewiesen worden. Vielmehr ist bei allen bisher untersuchten Formen gezeigt worden, daß nur die Zygote diploid ist, alle vegetativen Zellen dagegen haploid.

4. Das Verhalten der Gameten bei Ausbleiben der Kopulation.

Jede *Chlamydomonas eugametos*-Zelle ist Gamet und kann sich, wenn sie nicht kopuliert, einfach durch Teilung weiterentwickeln. Ähnlich verhält sich nach Strehlow (1929) und nach eigenen Beobachtungen *Chlamydomonas monoica*. Doch pflegen bei dieser Art die Gameten in ihrer Größe eine Mittelstellung zwischen jungen und ausgewachsenen Zellen einzunehmen. Völlig ausgewachsene Individuen kopulieren niemals miteinander oder mit kleineren Zellen, während bei *Chlamydomonas eugametos* auch die größten vegetativen Zellen untereinander und mit kleineren kopulieren können. Wenn die Kopulation der Gameten von *Chlamydomonas monoica* unterbleibt, entwickeln sich die Zellen, wenn sie in neue Nährlösung übertragen werden, ungeschlechtlich weiter. Die Bedingungen, unter denen bei dieser Art Gameten auftreten, sind aber viel spezieller als bei *Chlamydomonas eugametos*. Bei *Chlamydomonas monoica* ist es nach längerer absolut reiner Kultur auf Agar nicht mehr möglich gewesen, durch Überführen in destilliertes Wasser Kopulationen hervorzurufen. Zu dieser Gruppe, in der die Gameten zwischen jungen und ausgewachsenen Zellen eine Mittelstellung einnehmen oder in der sich die Gameten von den vegetativen Zellen nicht unterscheiden, gehören sehr viele *Chlamydomonas*-Arten. Doch scheinen bei allen diesen Formen die Bedingungen der Gametenbildung bzw. der Kopulation eng begrenzt zu sein. Hierher gehört auch die von Pascher

(1931) beschriebene *Chlamydomonas paupera*. Aus den Angaben von Pascher ist zu schließen, daß bei dieser Art jeder vegetative Schwärmer Gamet ist. Werden gallertige Lager befeuchtet, so werden die Zellen schon nach einer halben Stunde beweglich; es sind alles Gameten.

Ein weiteres Glied dieser Reihe ist *Chlorogonium elongatum* und *Chlorogonium euchlorum*. Bei diesen Formen finden nach Hartmann (1927), nach Schulze (1927) und anderen, auch nach eigenen Beobachtungen, bei der Gametenbildung gewöhnlich vier Kernteilungen statt, während bei der ungeschlechtlichen Vermehrung meist nur zwei Kernteilungen vor sich gehen. Gameten werden daher zu 32, ungeschlechtliche vegetative Individuen zu vier gebildet. Die Gameten zeichnen sich durch ihre geringe Größe aus. Aber auch diese Gameten wachsen, wenn sie nicht kopulieren, zu normalen Zellen heran und vermehren sich durch Teilung weiter. Schulze hat eine Zelle von *Chlorogonium euchlorum*, die in 32 Gameten aufgeteilt war, isoliert. Es entstand daraus wieder eine normale Kultur. Dasselbe ist bei *Chlorogonium elongatum* der Fall. Mehrere Zellen von *Chlorogonium elongatum*, die in 32 Zellen aufgeteilt sind, werden isoliert. Da die Zellen dieser getrenntgeschlechtlichen Alge nur dem einen Geschlecht angehören, sind Kopulationen ausgeschlossen. Nach einigen Tagen sind die inzwischen freigewordenen Gameten zu Zellen normaler Größe herangewachsen und vermehren sich durch Bildung von vier Tochterzellen usf. Einmal ist wieder eine Aufteilung in 32 Zellen beobachtet worden. Aus einem Gameten entstehen also durch Teilungen wieder Gameten. Die Gameten werden bei den *Chlorogonium*-Arten auch nur unter bestimmten Bedingungen gebildet. Man muß bei allen Formen, bei denen sich die Gameten von den vegetativen Individuen deutlich oder doch etwas unterscheiden, zweierlei streng voneinander trennen. Zunächst einmal sind bestimmte Außenfaktoren zur Bildung der Geschlechtszellen notwendig. Das sind die Gametenbildungsbedingungen und vielleicht die „Kopulationsstimmung“ im Sinne von Czurda und Mainx (1931). Es werden bei Oedogonien z. B. die Geschlechtsorgane gebildet. Die Kopulationsbedingungen im engeren Sinne bewirken, daß zwei Geschlechtszellen zusammentreffen. Diese Anlockung kommt zustande, wenn die Geschlechtszellen (Gameten) spezifische Stoffe ausscheiden, wie unten bewiesen werden wird. Diese Stoffe werden nur unter bestimmten Bedingungen, die nicht mit den Gametenbildungsbedingungen übereinzustimmen brauchen, gebildet. Durch diese Stoffe werden die „morphologischen“ Gameten erst zu reaktions-

fähigen Gameten; doch dann kopulieren sie, wenn beide Geschlechter vorhanden sind und jedes seinen spezifischen Stoff ausscheidet, unbedingt. Bei *Protosiphon botryoides* und bei *Stephanosphaera pluvialis* komme ich hierauf noch einmal zurück.

Am Ende dieser Reihe steht *Stephanosphaera pluvialis*. Bei dieser Art werden Gameten zu 16, 32 oder 64 in einer Zelle gebildet. Durch Form und Größe unterscheiden sie sich wesentlich von den vegetativen Zellen. Die Gameten sind nicht entwicklungsfähig. Finden sie keinen Partner, so kommen sie zur Ruhe, runden sich ab und umgeben sich mit einer dünnen Membran. Nach kurzer Zeit werden sie aber farblos und sterben ab, auch wenn sie in neue Nährlösung übertragen werden (40 Versuche).

Bei einem primitiven Organismus wie z. B. *Chlamydomonas eugametos* ist jede Zelle Gamet, unter Bedingungen, deren Grenzen fast mit denen des Lebens der Zellen überhaupt zusammenfallen (z. B. Temperatur 4—36 : 0—38°; p_H 4,5—9 : 4—10). Man kann hier noch nicht Kopulations- und Gametenbildungsbedingungen trennen, da schon der Begriff der Gametenbildung einen morphologischen Vorgang ausdrückt; dieser fehlt aber bei *Chlamydomonas eugametos*. Man kann sich nun vorstellen, daß die Spezialisierung der Gameten endlich so weit kommt, daß die Gameten sich ohne Befruchtung nicht weiterentwickeln können, wie bei *Stephanosphaera pluvialis*. Aber auch die Bedingungen der Gametenbildung sind gleichzeitig komplizierter geworden. So werden z. B. bei *Stephanosphaera pluvialis* Gameten nur bei Nährsalzentzug gebildet. Eine weitere Verwicklung tritt ein, wenn die Kopulationsbedingungen von den Gametenbildungsbedingungen abweichen, z. B. bei *Protosiphon botryoides* und *Stephanosphaera pluvialis* (vgl. S. 502 u. 515).

5. Gruppenbildung.

Gruppenbildungen von Gameten sind bereits bei verschiedenen Algen bekannt geworden: bei *Ectocarpus siliculosus* nach Berthold (1881), Oltmanns (1897; 1899) und Hartmann (1925); bei *Dasycladus clavaeformis* nach Jollos (1926); bei *Chaetomorpha aera* nach Hartmann (1929); bei *Ulva*- und *Cladophora*-Arten nach Föyn (1929); bei *Tetraspora lubrica* nach Geitler (1931); bei *Hydrodictyon reticulatum* und *Polytoma uvella* nach Mainx (1931); bei *Chlamydomonas paupera* nach Pascher (1931); auch bei *Synchytrium*-Arten sind von Kusano (1930) und von Köhler (1930) Gruppen beobachtet worden.

Bei Kombination der beiden geschlechtsverschiedenen Stämme von *Chlamydomonas eugametos* entstehen Gruppen. Innerhalb der Bedingungen, die für Kopulationen überhaupt notwendig sind, finden auch Gruppenbildungen statt. Bevor diese Erscheinungen geschildert werden, muß kurz darauf hingewiesen werden, daß alle Versuche bei größter Sauberkeit ausgeführt worden sind. Alle Glasgeräte werden mit Chromschwefelsäure gereinigt und dann in destilliertem Wasser ausgekocht. Ebenso werden auch die Pipetten behandelt. Die Gruppenbildungen werden auf hohl geschliffenen Objektträgern vorgenommen, die nach der Beobachtung in eine feuchte Kammer gestellt werden, um durch das Eindunsten der Flüssigkeit hervorgerufene Störungen auszuschließen. Stets werden auch Kontrollen in Boveri-Schalen (aus Jenaer Glas) angesetzt. Nur auf diese Weise können Irrtümer vermieden werden.

Das für die Gruppenbildungsversuche verwendete Zellmaterial wurde auf Agar kultiviert. Am Tage vor dem Versuch wurde entweder das Zellmaterial mit einer Platinöse vom Agar abgehoben und in eine Nährlösung gebracht oder die Zellen wurden einfach auf dem Agar mit der betreffenden Nährlösung begossen. Solange die Zellen in den Lösungen beweglich sind (2—6 Wochen), können sie für die Gruppenbildungsversuche verwendet werden. Es ist gleichgültig, ob die Alge auf Kolkwitz-, Erdabkochungs- oder Knop (sauer bzw. alkalisch)-Agar kultiviert wird. Auch die Nährlösung, die zugegeben wird, spielt keine Rolle; *Volvox*-Lösung, Knop 0,05; Kolkwitz 0,1; Benecke 0,08; ebenso der p_H-Wert (4—9,5). Auch in Zuckerlösungen finden Gruppenbildungen statt. Die Zellen werden in allen Medien bald beweglich und behalten die gleiche Reaktionsfähigkeit, solange wie sie umherschwimmen.

Föyn (1929) hat an getrenntgeschlechtlichen *Cladophora*-Arten gefunden, daß es gleichgültig ist, ob man viele Gameten des einen Geschlechtes mit wenig des anderen kombiniert oder umgekehrt; stets gibt es Gruppenbildungen, nur das Mengenverhältnis ist entscheidend. Auf Grundlage der Gruppenbildung ist also eine Identifizierung der weiblichen und männlichen Gameten bei dieser Form nicht möglich; im Gegensatz zu dem getrenntgeschlechtlichen *Ectocarpus siliculosus*, bei dem nach Hartmann (1925) die weiblichen Gameten früher ihre Beweglichkeit verlieren als die männlichen, welche die weiblichen in großer Anzahl umschwärmen, trotz morphologischer Gleichheit der männlichen und weiblichen Gameten. Ähnliche Versuche hat Geitler (1931) mit der getrenntgeschechtlichen *Tetraspora lubrica* ausgeführt; er hat beobachtet, daß bei Zusammen-

geben von wenig und gleich viel Gameten beiderlei Geschlechtes keine Gruppen, sondern nur einzelne Paare auftreten; bei Verwendung großer und gleicher Gametenmengen entstehen 20—30zellige Gruppen, aus denen halb so viel Zygoten hervorgehen und bei Kombination von wenig Gameten des einen Geschlechtes und viel des anderen werden 10zellige Gruppen gebildet, aus denen nur je eine Zygote hervorgeht. Alle Versuche sind reziprok möglich.

Gruppenbildungsversuche.

1. Viel + × viel —; viel — × viel +: Ohne Unterschied. „viel" bedeutet: Die Flüssigkeit ist dunkelgrün gefärbt; die Zellen bilden fast eine einheitliche Masse, so daß die Beweglichkeit stark eingeschränkt ist. In dem Augenblick, in dem man dem einen Geschlecht das andere zugegeben hat, innerhalb weniger als einer Sekunde (Geitler nennt es mit der Genauigkeit einer chemischen Reaktion) sieht man erst ca. 10zellige Gruppen, eine Sekunde später sind sie ungefähr 50zellig, dann ca. 100zellig und noch größer. Die großen Gruppen sind makroskopisch als Punkte sichtbar. Solche Gruppen verschmelzen miteinander und bilden immer größere Konglomerate. Es sind kaum noch frei umherschwimmende Zellen vorhanden; in den Gruppen sind alles Paare. Einzelne Paare schwimmen nicht umher. Diese Riesengruppen bleiben ungefähr 45 Minuten erhalten (= Durchschnittswert aus 20 Versuchen; Grenzen 30—60 Minuten). Nach und nach lösen sich dann einzelne Paare von den Konglomeraten ab und schwimmen frei umher. Die Gruppen werden immer kleiner, bis sie maximal nach 3 Stunden alle aufgelöst sind und nur noch Paare umherschwimmen.

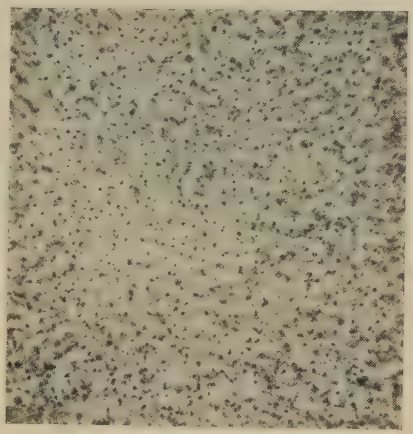

Fig. 3. *Chlamydomonas eugametos.* Die Gameten eines Geschlechtes sind im Tropfen regelmäßig verteilt. Menge = „mittel". (Vergr. 45 ×.)

2. Mittel + × viel —; viel + × mittel —: Ohne Unterschied. „mittel" bedeutet, daß in dem verwendeten Tropfen zwischen den einzelnen Zellen größere Zwischenräume, ca. zehn Zellängen sind, so daß die Beweglichkeit der Zellen nicht behindert ist (Fig. 3). Die Kultur-

flüssigkeit hatte nur einen hellgrünen Schimmer. Die Gruppenbildung erfolgt ebenso schnell wie in der ersten Serie. Es entstehen die über 100 zelligen (bis 500) Riesenkonglomerate, freie Paare schwimmen nicht umher (Fig. 4). Nach einer Stunde sind viele einzelne Paare vorhanden, nach $1^1/_2$—2 Stunden sind die Gruppen alle aufgelöst. In dieser Serie bleiben Gameten übrig, und es konnte der Nachweis erbracht werden, daß die Restgameten, die nicht kopuliert haben, nur dem Geschlecht angehören, das als „viel" zugegeben worden ist. Die Planozygoten kommen meist nach 24 Stunden zur Ruhe; die noch beweglichen Zellen werden in zwei Teile geteilt und zu der einen Portion wird das eine Geschlecht, zu der anderen das andere gegeben. Z. B. gab bei der Kombination von (mittel + × viel —) Teil 1 × — nicht eine einzige Kopulation, Teil 2 × + dagegen sehr zahlreiche Kopulationen. Es sind also nur —-Gameten übrig geblieben. Ein weiterer Beweis wird noch in der 5. Versuchsserie gegeben werden.

Fig. 4. *Chlamydomonas eugametos.* Normale Gruppenbildung. „Riesenkonglomerate" und kleinere Gruppen. (Vergr. 45 ×.)

3. Mittel + × mittel —; mittel — × mittel +: Ohne Unterschied. Innerhalb weniger als einer Sekunde entstehen erst 10-zellige, dann ca. 20—30 zellige Gruppen, äußerst selten größere bis 50 zellige. Daneben entstehen in der Flüssigkeit einzelne Paare, die sofort frei umherschwimmen. Nach 60 Minuten sind nur noch Paare in der Flüssigkeit.

4. Wenig + × wenig —; wenig — × wenig +: Ohne Unterschied. „wenig" bedeutet hier, daß im Gesichtsfeld des Mikroskopes ca. 5—10 Zellen zu beobachten sind. Sofort nach dem Zusammengeben sieht man sehr kleine Gruppen, die höchstens 10 zellig sind. Es entstehen sehr viele einzelne Paare, ohne Gruppen zu bilden. Besonders wenn noch weniger Zellen zu den Kombinationen verwendet werden, läßt sich mikroskopisch (sogar mit Immersion) die Entstehung der Gruppen sehr deutlich verfolgen. Zwei Zellen berühren sich mit den vorderen Enden, verschlingen sich mit den

Geißeln, zappeln hin und her und stoßen aufeinander ein. Während dieser Zeit kommt ein dritter Gamet hinzu, dann ein vierter, fünfter, sechster Gamet. Dann kann z. B. der dritte mit dem fünften Gameten anfangen sich mit den Geißeln zu verschlingen und aufeinander zuzustoßen, schließlich sind zehn Zellen zusammen, zwei Paare und sechs freie Zellen. Von den letzten fangen dann wieder zwei an zu kopulieren usf. Manchmal kann auch ein Gamet wieder wegschwimmen, ein anderer kommt hinzu, bis schließlich eine 10zellige Gruppe aus fünf Paaren besteht. Diese kleinen Gruppen bleiben ca. 30 Minuten zusammen, dann zerfallen sie und es sind nur noch Einzelpaare da.

5. Sehr wenig + × mittel —; mittel + × sehr wenig —: Ohne Unterschied. „sehr wenig" bedeutet, daß im Tropfen nur ca. 5—10 Zellen vorhanden sind. Während in den Serien 1—4 sowohl durch Bakterien verunreinigte, wie auch absolut reine Kulturen verwendet werden können, dürfen bei dieser Serie nur absolut reine Kulturen genommen werden, da bei bakterienhaltigen Kulturen „Störungen" auftreten, die später besprochen werden sollen. Bei diesen Kombinationen treten bis zu 10zellige Gruppen auf und zwar höchstens so viel Gruppen als Zellen des „sehr wenig"-Geschlechtes vorhanden sind. Aus jeder Gruppe geht nur ein Paar hervor, wie die mikroskopische Prüfung ergab. Die Gruppen bleiben ca. 15 Minuten beisammen.

6. Sehr wenig + × sehr wenig — und umgekehrt: Ohne Unterschied. Es wurden hier 5—10 Zellen von jedem Geschlecht zusammengegeben. Es entstehen keine Gruppen, sondern nur Paare.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die Größe und die Dauerhaftigkeit der Gruppen von der Menge der Zellen der beiden Geschlechter abhängig ist. Alle Versuche sind reziprok möglich. Die in den Versuchsserien übrig bleibenden Zellen gehören immer einem Geschlecht an, wie es bei Serie 2 wahrscheinlich gemacht werden konnte. Ein weit sicherer Beweis folgt aber aus Versuchsserie 5. Flüssigkeit mit Restzellen von Serie 2 (viel + × mittel —) wird so verdünnt, daß jeder Tropfen nur 5—10 Zellen enthält. 20 Tropfen werden auf 20 verschiedene Objektträger verteilt. Zu den ersten Tropfen werden +-Gameten (in „mittel"-Mengen) hinzugegeben: Es treten keine Gruppen und keine Paare auf. Zu den anderen zehn Tropfen wurden —-Gameten (auch in „mittel"-Mengen) gegeben: In jedem dieser Tropfen treten soviel Gruppen und später einzelne Paare auf, wie von Restzellen in dem Tropfen enthalten sind. Alle diese Restzellen sind reaktionsfähig; bei *Chlamydomonas eugametos* sind eben alle beweglichen Zellen Gameten.

6. „Geschlechtsstoffe".

Geschlechtsspezifische Stoffe sind bei Algen zuerst von Jollos (1926) nachgewiesen worden. Er hat gefunden, daß z. B. ein schwaches +-Geschlecht, das mit einem Filtrat von einem starken —-Geschlecht behandelt worden ist, durch diese Einwirkung —-Charaktere angenommen hat. Diese Erscheinung kann nur als die Wirkung eines Stoffes gedeutet werden. Da diese Versuche reziprok möglich sind, werden also bei *Dasycladus clavaeformis* zwei voneinander verschiedene Stoffe ausgeschieden. Später hat Geitler (1931) bei *Tetraspora lubrica* beobachtet, daß in Extrakten (oder Zentrifugaten) des einen Geschlechtes das andere Geschlecht Gruppen bildet; es finden aber keine Kopulationen statt. Der hierbei wirksame „Geschlechtsstoff" behält seine Wirksamkeit ca. 7 Stunden und wird bei 40° unwirksam. „Es ist bemerkenswert, daß als auslösender Faktor nur die „Geschlechtsstoffe" des entgegengesetzten Geschlechtes wirken, daß es sich also keineswegs um eine unspezifische, vom Geschlecht völlig unabhängige und mit der normalen Sexualreaktion nicht näher verwandte Erscheinung handelt."

a) Herstellung der Zentrifugate und Filtrate.

Die Zentrifugate und Filtrate wurden aus dunkelgrüner Kulturflüssigkeit (= „viel" bei der Gruppenbildung) hergestellt. Beim ersten Zentrifugieren (3—5 Minuten lang) waren meistens noch sehr viele Zellen in der überstehenden Flüssigkeit (im Zentrifugat). So mußte dann immer noch ein zweites und ein drittes Mal abzentrifugiert werden. Auch dann waren noch vereinzelte Zellen vorhanden; es wurde daher jeder Tropfen für die Versuche mikroskopisch geprüft. Nur Tropfen ohne Zellen wurden benutzt. Die Filtrate wurden zuerst mit einem Buwa-Apparat, später auch mit einem Thiessenapparat hergestellt, die beide von der Membranfiltergesellschaft in Göttingen geliefert werden. Die zu filtrierende Flüssigkeit steht in beiden Apparaten in einem Glasbehälter über dem Filter; darunter kommt eine Siebplatte aus Porzellan (oder Metall) und dann das Ableitungsrohr aus Glas, aus dem die filtrierte Flüssigkeit aufgefangen wird. Im Gegensatz zum Buwa-Apparat kommt die zu filtrierende Flüssigkeit im Thiessenapparat fast gar nicht mit Gummi in Berührung; auch ist letzter im Dampf sterilisierbar. Beide Apparate werden an eine Saugflasche angeschlossen. Für jedes Geschlecht wurde ein besonderer Apparat benutzt, um eine Vermischung der Filtrate zu vermeiden. Die Glasgeräte wurden

mit Chromschwefelsäure gereinigt, mit Wasser ausgekocht und sterilisiert. Das Filtrat wurde in kleinen Röhrchen aus Jenaer Glas aufgefangen, die auch vorher sorgfältig gereinigt wurden. Der geringe Durchmesser der Filterfläche (3,5–4,0 cm) erlaubte die Filtration von sehr geringen Flüssigkeitsmengen. Als Filter dienten Membranfilter, die aus Gelen von Estern der Cellulose bestehen. Verwendet wurden meist Filter, die auf 0,75 μ maximaler Porenweite geeicht waren und als bakteriendicht geliefert wurden. Für einige Versuchsserien standen Ultrafilter von 10 $\mu\mu$ Porenweite zur Verfügung. Die Filter wurden in destilliertem Wasser aufbewahrt; für jedes Geschlecht wurde ein besonderes Filter verwendet, das nur einen Tag benutzt wurde. An Kulturen standen zur Verfügung: absolute Reinkulturen und verschmutzte Kulturen, in denen sehr viele Bakterien vorhanden waren, manchmal sogar auch farblose Flagellaten und Chlorellen.

Zur Vereinfachung der Protokolle werden folgende Abkürzungen eingeführt: + F = Filtrat von +-Gameten, + Z = Zentrifugat von +-Gameten, — F und — Z = Filtrat und Zentrifugat von —-Gameten, r = absolute Reinkulturen, v = verschmutzte Kulturen; Bakt. = Bakterien, + = +-Gameten, — = —-Gameten.

Aus den folgenden Versuchen hat sich gezeigt, daß es gleichgültig ist, ob zu dem Zentrifugat oder Filtrat absolut reine oder verunreinigte Kulturen gegeben werden. In den zitierten Protokollen wird dieser Unterschied nicht gekennzeichnet. Es wurde aber jedesmal geprüft.

b) Gruppenbildung in Zentrifugaten und Filtraten.

+++ Vorversuche: Die ersten Versuche mit *Chlamydomonas eugametos* wurden mit verunreinigten Kulturen angestellt und ergaben mit Zentrifugaten positive Resultate. Werden zu +-Zentrifugaten —-Gameten hinzugegeben, so entstehen nach einigen Sekunden Gruppen, aber niemals so schnell wie bei normaler Gruppenbildung. Diese Gruppen sind ca. 10—30zellig; sie entstehen in großer Zahl. Diese Gruppenbildung hält höchstens 1 Stunde lang vor. Es finden aber niemals Kopulationen statt. Dieselben Ergebnisse wurden erhalten mit —-Zentrifugaten und +-Gameten; bei Zugeben desselben Geschlechtes werden keine Gruppen gebildet.

Alle weiter geschilderten Versuchsserien wurden mehrmals an verschiedenen Tagen wiederholt und ergaben stets dieselben Befunde. In allen Fällen wurde zu den Filtraten und zu den Zentri-

fugaten auch dasselbe Geschlecht hinzugegeben, aus denen sie hergestellt worden sind; doch traten niemals Reaktionen auf.

+++ Filtrate und Zentrifugate von verunreinigten und absoluten Reinkulturen: Tabelle 3 zeigt, daß nur in Zentrifugaten von verunreinigten Kulturen Gruppenbildung auftritt, nicht dagegen in

Tabelle 3.

Chlamydomonas eugametos. Wirkung verunreinigter, bakterienhaltiger (v) und nicht verunreinigter (r) Zentrifugate (Z) und Filtrate (F) von +- und —-Gameten auf Gameten desselben und des anderen Geschlechtes. × bedeutet Gruppenbildung, o keine Gruppenbildung.

Filtrat oder Zentrifugat	Gameten	Reaktion
+ Z v	—	×
+ Z r	—	o
+ F v	—	o
+ F r	—	o
+ Z v	+	o
— Z v	+	×
— Z r	+	o
— F v	+	o
— F r	+	o
— Z v	—	o

Zentrifugaten von absoluten Reinkulturen und in allen Filtraten. Es scheint also, als ob diese Verunreinigungen in den Zentrifugaten an der Gruppenbildung beteiligt sein müssen. Oft war das Zentrifugat von verunreinigten Kulturen getrübt und bestand aus mikroskopisch nachweisbaren Bakterien.

+++ Gruppenbildung in Zentrifugaten von absoluten Reinkulturen und in Filtraten, denen beiden Bakterien zugesetzt werden: Für diese Versuche wurden Bakterien verwendet, die im Agar, der mit nicht sterilem Leitungswasser verdünnt wurde, aufgetreten waren. Diese Bakterienkolonien wurden aus dem Agar mit einer Platinöse herausgehoben und dann in die Zentrifugate oder Filtrate gebracht. 1 Stunde nach dem Zugeben der Bakterien wurde dann das andere Geschlecht hinzugefügt und dann auf Gruppenbildung untersucht. Das Ergebnis zeigt Tabelle 4. Dasselbe Geschlecht zugegeben ist also ohne Wirkung, ebenso, wenn nur einer Bakterienaufschwemmung in Wasser Gameten hinzugefügt werden. Es besteht kein Unterschied zwischen Filtraten von absoluten Reinkulturen und von verunreinigten Kulturen. Im folgenden werden nur noch Filtrate verwendet, da diese leichter herzustellen sind als die Zentrifugate; es wurden aber manchmal wieder Proben mit Zentrifugaten

Tabelle 4.

Chlamydomonas eugametos. Wirkung verunreinigter (v) und nicht verunreinigter (r) Filtrate (F) und Zentrifugate (Z) von +- und —-Gameten nach Zusatz einer Reinkultur von Bakterien auf Gameten des anderen und desselben Geschlechtes. × Gruppenbildung, o keine Gruppenbildung.

Filtrate oder Zentrifugate	Gameten	Reaktion
+ F r, Bakt.	—	×
+ F v, Bakt.	—	×
+ Z r, Bakt.	—	×
— F v, Bakt.	+	×
— F r, Bakt.	+	×
— Z r, Bakt.	+	×
+ F r, Bakt.	+	o
— Z r, Bakt.	—	o
Bakt.	+	o
Bakt.	—	o

von absoluten Reinkulturen gemacht; sie ergaben dieselbe Wirkung wie die Filtrate. Filtrate und Zentrifugate, die keine Verunreinigungen enthalten, sind unwirksam, wenn ihnen das andere Geschlecht hinzugegeben wird. Werden aber Bakterien hinzugefügt und danach erst das andere Geschlecht, so werden Gruppen gebildet. Es scheint also, daß jedes Geschlecht einen spezifischen Stoff ausscheidet. Als Kontrolle dienen Bakterien. Denn Bakterien und Gameten geben keine Reaktion; filtratbehandelte Bakterien geben nur Gruppen, wenn das entgegengesetzte Geschlecht hinzugegeben wird (Fig. 5).

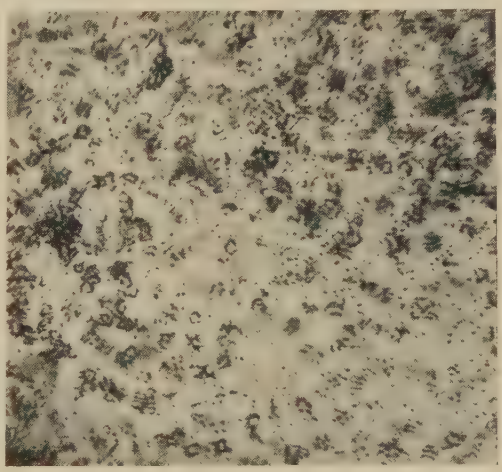

Fig. 5. *Chlamydomonas eugametos.* Gruppenbildung von +-Gameten in einem mit Bakterien versetzten Filtrat von —-Gameten. (Vergr. 45×.)

+++ Mikroskopische Beobachtung dieser Gruppenbildungen: Mikroskopische Beobachtung ergab in keinem Falle den Nachweis, daß einige der hinzugegebenen Gameten „umgestimmt" würden. Es verschlingen sich niemals zwei Gameten mit ihren Geißeln und stoßen aufeinander ein, sondern alle Zellen der Gruppe scheinen

auf einen nicht sichtbaren Mittelpunkt gerichtet zu sein. Der Nachweis, daß im Zentrum Bakterien liegen, konnte nicht erbracht werden. Bei Lebendbeobachtung ist es durch die lebhafte Bewegung der Gameten und durch das Hin- und Herzappeln unmöglich, ein „Zentrum" zu erkennen. Bei Fixierung werden alle Gruppen zerstört.

c) Eigenschaften der Stoffe.

+++ Anreicherung der Stoffe an andere Algen und an leblosem Material: Alle diese Versuche waren ohne Erfolg. Es gelang nur mit anderen Bakterien, die auf *Polytoma*-Agar gelbe Kolonien bildeten, nach Filtratbehandlung Gruppen hervorzurufen. Unbewegliche Zellen von *Lobomonas piriformis*, bewegliche und unbewegliche Zellen von *Chlamydomonas gyrus* und *Chlamydomonas gloeogama*, Chlorellen waren als Ersatz von Bakterien nicht geeignet. Werden die Bakterien durch Erhitzen auf 100° oder durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 60° abgetötet, so werden sie unwirksam. Filtrate mit solchen Bakterien versetzt, rufen keine Gruppenbildung nach Zugabe des entgegengesetzten Geschlechtes hervor. Der Ersatz der Bakterien durch Kaolin und Blutkohle ist nicht gelungen. Mit dem Filtrat durchtränkte Baumwollfäden oder Wasseragarstückchen üben auf das andere Geschlecht keine Wirkung aus. Auch der Nachweis einer Chemotaxis mit Kapillaren, die mit dem Filtrat gefüllt waren, hatte keinen Erfolg.

+++ Dauer der Filtrateinwirkung auf die Bakterien, bis die Gruppen auftreten: Aus ungefähr 50 Versuchen ergab sich eine durchschnittliche Dauer von 30 Minuten. Solange müssen die Bakterien in dem Filtrat bleiben, bis sich nach Zugeben des anderen Geschlechtes frühestens Gruppenbildung zeigt. Als geringste Zeit wurde einmal 20 Minuten gemessen.

+++ Dauer der Wirksamkeit der Stoffe (der Filtrate): Die Filtrate bleiben bei Zimmertemperatur sowohl im Licht wie im Dunkeln ca. 12 Stunden wirksam; d. h. werden nach dieser Zeit den Filtraten Bakterien hinzugegeben, so tritt 30 Minuten danach und später bei Zufügen des anderen Geschlechtes keine Gruppenbildung auf.

+++ Temperaturbeständigkeit der Filtrate: Die Filtrate werden durch kurzes Aufkochen unwirksam, ebenso auch beim Erwärmen auf 50°, 50 Minuten lang. Sie behalten aber ihre Wirksamkeit bei 40°, 5—120 Minuten; längerer Aufenthalt bei 40° schädigt die Filtrate. Die Grenze wird also bei 40° liegen. Werden Filtrate Temperaturen von —10° ausgesetzt, so bleibt die Wirksamkeit er-

halten, aber nur solange wie das Filtrat überhaupt zeitlich wirksam ist (12 Stunden). Die Filtrate gefrieren, solange sie wirksam sind, bei —10° nicht. Normale Nährlösung gefriert darin nach wenigen Minuten. Diese Eigenschaft wurde Hunderte von Malen nachgeprüft und ergab immer dieselbe Erscheinung.

+++ Filtration mit Ultrafeinfilter von 10 $\mu\mu$ Porengröße: Bei der Filtration durch einen Ultrafeinfilter von 10 $\mu\mu$ Porenweite werden die Filtrate unwirksam. Auch wirksame Filtrate durch ein Ultrafeinfilter geschickt, verlieren die Wirksamkeit. Das Filtrat gefriert sofort nach der Filtration bei —10°. Ob die Stoffe bei der Ultrafiltration zurückgehalten oder ob sie zerstört werden, konnte nicht entschieden werden.

+++ Filtrate von unbeweglichen Zellen: Die Zellen von *Chlamydomonas eugametos* werden in destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Hierin werden sie, wenn sie nicht stark erschüttert werden, nicht beweglich. Die Filtrate von unbeweglichen Zellen sind unwirksam. Auch Zentrifugate von verunreinigten unbeweglichen Zellen sind ohne Wirkung. Die Stoffe werden also nur ausgeschieden, wenn die Zellen beweglich sind, also wenn sie Gameten sind.

d) Ausscheidung der Stoffe im Licht.

Oben ist erwähnt worden, daß die Zellen in 1 proz. Zuckerlösung im Dunkeln beweglich werden und darin 12—48 Stunden beweglich bleiben. Wird ein Filtrat von Zellen, die 24 Stunden lang im Dunkeln in 1 proz. Zuckerlösung waren, hergestellt, dann Bakterien hinzugegeben und nach mehr als 30 Minuten das andere Geschlecht, so entstehen niemals Gruppen. Das Dunkelfiltrat enthält also den Stoff nicht; es gefriert auch sofort bei —10°. Werden Zellen, die im Licht in Zuckerlösung leben und deren Filtrate normale Wirksamkeit besitzen, ins Dunkle gebracht, so haben die Filtrate, die 12 Stunden danach und später davon hergestellt werden, keine Wirkung mehr. Hiermit ist also festgestellt worden, daß diese Stoffe nur im Licht und nur von beweglichen Zellen, also nur dann, wenn die Zellen kopulationsbereite Gameten sind, produziert werden.

Es ist bisher noch keine Beziehung hergestellt worden zwischen normaler Gruppenbildung und Kopulationen einerseits und der durch die Stoffe mit Hilfe der Bakterien entstehenden Gruppen andererseits; ob also zur normalen Gruppenbildung und Kopulationen diese Stoffe unbedingt notwendig sind. Um diesen Nachweis zu bringen, wurden folgende Versuche ausgeführt.

e) Wirkung des Lichtes auf Dunkelgameten.

Es steht also fest, daß Gameten trotz ihrer Beweglichkeit im Dunkeln in 1 proz. Zuckerlösung nicht kopulieren und keine Stoffe ausscheiden. Daraufhin wurde geprüft, wie lange die Zellen, die 24 Stunden in 1 proz. Zuckerlösung im Dunkeln sich befanden, belichtet werden müssen, bis Kopulationen stattfinden und bis wieder die Stoffe wirksam sind.

+++ Normale Kopulationen: Werden Dunkelgameten ans Licht gebracht, so treten keine Kopulationen auf. Es wurde nun die Zeit festgestellt, bis die ersten Kopulationen auftraten. Die Belichtung

Tabelle 5.

Chlamydomonas eugametos. Belichtungsdauer von +- und —-Dunkelgameten (in Minuten) bis Kopulationen auftreten.

Belichtung in Minuten von		Reaktion
Dunkel- +-Gameten	Dunkel- —-Gameten	
0	0	—
15	0	—
45	0	—
15	15	—
45	15	—
15	30	—
45	30	+
30	45	+
45	45	+
0	720	—
720	0	—
720	15	—
720	30	+
720	45	+

erfolgte an der künstlichen Sonne. Aus Tabelle 5 geht hervor, daß Kopulationen und Gruppenbildungen erst dann stattfinden, wenn jede der beiden Gametensorten ca. 30—45 Minuten belichtet worden ist.

+++ Filtrate: In den Protokollen bedeutet z. B. + F (15), daß es sich um ein Filtrat handelt, das aus 15 Minuten lang belichteten +-Dunkelgameten hergestellt worden ist.

Zugegeben wurden belichtete Gameten, gleichgültig ob 45 Minuten oder länger belichtet. Mit weniger als 45 Minuten belichteten Gameten gibt es keine Gruppen. Tabelle 6 zeigt, daß die Filtrate erst dann wirksam werden, wenn die Zellen, aus denen sie hergestellt werden, mindestens 45 Minuten lang belichtet werden.

Tabelle 6.

Chlamydomonas eugametos. Wirkung der Filtrate aus verschieden lange belichteten Dunkelgameten nach Zusatz von Bakterien auf Gameten desselben und des anderen Geschlechtes. × Gruppenbildung, o keine Gruppenbildung.

Filtrate	Gameten	Reaktion
+ F (0), Bakt.	—	o
+ F (15), Bakt.	—	o
+ F (30), Bakt.	—	o
+ F (60), Bakt.	—	×
+ F (60), Bakt.	+	o
— F (30), Bakt.	+	o
— F (45), Bakt.	+	×
— F (120), Bakt.	+	×
— F (120), Bakt.	—	o

f) Nachweis der „Geschlechtsstoffe".

+-Dunkelgameten, die 24 Stunden im Dunkeln in Zuckerlösung beweglich waren, werden in ein Filtrat von +-Lichtgameten, die 24 Stunden belichtet waren, gebracht und in diesem Filtrat 10, 20, 30, 40, 60 Minuten lang im Dunkeln gelassen; dann werden belichtete (12 Stunden) —-Gameten hinzugegeben. Nach einer Filtratbehandlung von 20 Minuten und länger treten dann sofort Kopulationen und Gruppen auf (Tabelle 7, I). Ebenso wurden —-Dunkelgameten (—-D) in einem Filtrat von 12 Stunden lang belichteten —-Gameten [— F (720)] 20 Minuten lang im Dunkeln (20′ D) gelassen und dann unter dem Mikroskop belichtete +-Gameten hinzugegeben. Es traten sofort Kopulationen auf (Tabelle 7, II). Dadurch, daß die Dunkelgameten im Dunkeln mit dem Lichtfiltrat behandelt werden, ist es ausgeschlossen, daß sie durch irgend etwas anderes als durch das Filtrat zu kopulationsfähigen Gameten geworden sind. Ohne Erfolg waren die Versuche III—VIII (Tabelle 7); III, IV: Bei

Tabelle 7.

Chlamydomonas eugametos. Behandlung von Dunkelgameten eines Geschlechtes mit Filtraten desselben Geschlechtes und darauffolgendes Zugeben von belichteten Gameten desselben und des anderen Geschlechtes. × Kopulationen, o keine Kopulationen.

Versuch	Gameten	Filtrat	Zeit	Gameten	Reaktion
I	+ D	+ F (720)	20′ D	—	×
II	— D	— F (720)	20′ D	+	×
III	+ D	+ F (720)	30′ D	+	o
IV	— D	— F (720)	30′ D	—	o
V	+ D	+ F (o)	30′ D	—	o
VI	— D	— F (o)	30′ D	+	o
VII	+ D			—	o
VIII	— D			+	o

Zugeben desselben Geschlechtes, wenn sonst die Behandlung wie bei I und II war, erfolgen keine Kopulationen; VII, VIII: Werden zu Dunkelgameten belichtete Gameten des anderen Geschlechtes hinzugefügt, so tritt keine Reaktion ein; V, VI: Die Behandlung mit Dunkelfiltraten [F(0)] ist wirkungslos.

Weiter wurden folgende Versuche ausgeführt. +-Dunkelgameten wurden im Dunkeln 30 Minuten lang mit einem Filtrat aus 45 Minuten lang belichteten +-Gameten behandelt; ebenso wurden die —-Dunkelgameten 30 Minuten lang mit einem Filtrat aus 45 Minuten lang belichteten —-Gameten behandelt. Danach wurden die beiden Stämme kombiniert; es traten sofort Kopulationen auf (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8.

Chlamydomonas eugametos. Kombinationen von Dunkelgameten beider Geschlechter, die verschieden lange mit Filtraten aus verschieden lange belichteten Gameten behandelt worden sind. × Kopulationen, o keine Kopulationen.

+				—			Reaktion
	Filtrat	Zeit			Filtrat	Zeit	
+ D	+ F (15)	60' D	×	— D	— F (45)	30' D	o
+ D	+ F (720)	60' D	×	— D	— F (15)	30' D	o
+ D	+ F (45)	12' D	×	— D	— F (45)	30' D	o
+ D	+ F (45)	20' D	×	— D	— F (45)	20' D	×

Aus diesen Versuchen, die in großer Zahl ausgeführt worden sind, folgt zunächst einmal, daß die Dunkelgameten, die keinen Stoff ausscheiden, den in den Lichtfiltraten enthaltenen Stoff irgendwie speichern müssen und zwar den des eigenen Geschlechtes, so daß die Gameten reaktionsfähig werden. Das hat zur Folge, daß beim Zugeben des anderen Geschlechtes Gruppen und Kopulationen auftreten, was bei unbehandelten Dunkelgameten nicht der Fall ist. Da die Lichtfiltratbehandlung im Dunkeln stattfindet, können die Dunkelgameten nur durch das Filtrat aus ihrem indifferenten Zustand zu kopulationsfähigen Gameten werden. Ein weiterer Beweis für die Wirkung des Filtrates ist darin gegeben, daß die Kopulationen und Gruppenbildungen sofort nach dem Zugeben des anderen Geschlechtes auftreten. Normale Kopulationen und Gruppen findet man sonst bei Dunkelgameten erst, wenn sie mindestens 30 Minuten lang belichtet worden sind. Weiter wurde gefunden, daß die Filtratbehandlung mindestens 20 Minuten dauern muß, wenn die Gameten wenigstens 45 Minuten lang belichtet worden sind. Aus Tabelle 8 ergibt sich, daß es keine positiven Reaktionen gibt,

wenn die Minimalwerte für die Herstellung der Lichtfiltrate oder für die Filtratbehandlung unterschritten sind. So müssen in einer Kombination mindestens alle vier Zeitwerte ihren Minimalwirksamkeitswert erreicht haben.

Weitere Zeit- und Mengenversuche: +-Dunkelgameten wurden 20 Minuten lang im Dunkeln mit einem 45 Minuten +-Lichtfiltrat behandelt, zur Kontrolle danach belichtete --Gameten hinzugegeben. Es fanden Kopulationen und Gruppenbildungen statt. Wurde von diesen filtratbehandelten Dunkelgameten im Dunkeln ein neues Filtrat hergestellt, danach Bakterien zugegeben, 30 Minuten später belichtete ——Gameten, so trat keine Gruppenbildung auf. Bei Behandlung mit einem 2 Stunden ——Lichtfiltrat, wenn sonst alles gleich blieb, waren die Filtrate wirksam und es traten Gruppen auf, aber natürlich keine Kopulationen. Werden also für die Lichtfiltratherstellung und für die Filtratbehandlung gerade die minimalen Zeiten angewendet und daraus dann ein neues Filtrat hergestellt, so ist es unwirksam. Der Stoff war in dem 45 Minuten ——Lichtfiltrat in zu geringer Menge vorhanden, so daß er von den Dunkelgameten vielleicht vollständig gespeichert wurde und das neue Filtrat keinen oder nur sehr wenig Stoff enthielt. Die daraufhin zugesetzten Bakterien konnten daher kaum den Stoff speichern, so daß nach Zugeben des anderen Geschlechtes keine Gruppenbildung erfolgte. Anders war es bei dem 2 Stunden ——Lichtfiltrat. Hier war genügend Stoff vorhanden und es konnte zum Schluß Gruppenbildung auftreten.

Werden wirksame Filtrate beider Geschlechter miteinander vermischt, so zeigt sich dieses „Misch-Filtrat“ beiden Geschlechtern gegenüber unwirksam. Mit den „Misch-Filtraten“ läßt sich weder nach Zugeben von Bakterien und danach reaktionsfähiger Gameten des einen oder des anderen Geschlechtes Gruppenbildung hervorrufen, noch können Dunkelgameten des einen wie des anderen Geschlechtes damit reaktionsfähig gemacht werden.

g) Umstimmungsversuche.

Zu +-Dunkelgameten wurden ——Lichtfiltrate gegeben und verschieden lange im Dunkeln damit behandelt; dann wurden +- bzw. ——Gameten hinzugegeben. Dieselben Versuche wurden mit ——Dunkelgameten ausgeführt. Tabelle 9 zeigt, daß eine „Umstimmung“ nicht möglich ist. Die +-Dunkelgameten bleiben nach Behandlung mit einem ——Lichtfiltrat indifferent. Die +-Dunkelgameten können

also nur ihren eigenen Stoff speichern oder besser durch ihren eigenen Stoff reaktionsfähig werden. Dasselbe gilt für die ——-Gameten.

Tabelle 9.

Chlamydomonas eugametos. „Umstimmungsversuche."

Gameten	Filtrat	Zeit	Gameten	Reaktion
+ D	— F (45)	40' D	+	o
+ D	— F (45)	40' D	—	o
+ D	— F (720)	60' D	+	o
+ D	— F (720)	60' D	—	o
— D	+ F (720)	120' D	+	o
— D	+ F (720)	120' D	—	o

An dieser Stelle müssen die Umstimmungsversuche von Jollos (1926) an Gameten von *Dasycladus clavaeformis* erwähnt werden. Jollos hat nachgewiesen, daß z. B. ein schwaches +-Geschlecht, das mit einem Filtrat von einem starken ——Geschlecht behandelt worden ist, durch diese Einwirkung ——Charaktere angenommen hat und darauf mit einem starken +-Geschlecht reagiert, wenn auch keine lebensfähigen Zygoten gebildet werden. Es konnte also eine Art Umstimmung erzielt werden. Es liegt nahe, diese Erscheinungen stofflich zu deuten. Jollos war, wie bereits oben darauf hingewiesen wurde, der erste, der den Nachweis von zweierlei Stoffen erbracht hatte, was von Mainx (1931) in seiner Theorie über Gruppenbildungen übersehen worden ist. Es sind nach den Versuchen von Jollos bei *Dasycladus* sicher zwei verschiedene Stoffe vorhanden.

h) Zusammenfassung.

Durch die oben geschilderten Versuche ist bewiesen worden, daß jedes Geschlecht einen spezifischen Stoff ausscheidet. Diese Stoffe, deren Eigenschaften oben mitgeteilt worden sind, werden nur im Licht gebildet. Gameten beiderlei Geschlechtes können nur kopulieren, wenn jedes Geschlecht seinen spezifischen Stoff besitzt, der im Licht selbst produziert oder im Dunkeln aus einem Lichtfiltrat gespeichert wird. So können im Dunkeln indifferent gewordene Gameten durch Behandlung mit einem Lichtfiltrat im Dunkeln wieder reaktionsfähig werden. Fehlt bei den Kombinationen einem Geschlecht der Stoff, so finden keine Kopulationen statt. Werden Lichtfiltrate auf 50° erhitzt, so verlieren sie ihre Wirksamkeit und man kann damit Dunkelgameten nicht mehr reaktionsfähig machen. Ebenso ist auch das Lichtfiltrat unwirksam, das

erst 15 Stunden nach seiner Herstellung zur Behandlung von Dunkelgameten verwendet worden ist.

Es besteht nun die Schwierigkeit, wie die Gruppenbildung oder überhaupt die Anlockung erklärt werden soll. Die einfachste Annahme ist, daß jedes Geschlecht denselben Stoff, aber in verschiedener Konzentration, ausscheidet. Dann wird zur Anlockung der Gameten eine einfache Konzentrationsdifferenz genügen. Diese Annahme macht Mainx (1931) für *Hydrodictyon*, einem gemischtgeschlechtlichen Organismus mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung. Man könnte sich auch vorstellen, daß bei *Chlamydomonas eugametos* das eine Geschlecht genotypisch die Fähigkeit besitzt den Stoff in einer hohen Konzentration, das andere Geschlecht nur immer in einer niederen Konzentration zu bilden. Dann müßte man aber das letzte durch eine Verdünnung des ersten Stoffes reaktionsfähig machen können. Das ist aber trotz zahlreicher Versuche nicht gelungen. Bei *Chlamydomonas eugametos* werden zwei voneinander verschiedene Stoffe gebildet. Das ist vermutlich auch bei den anderen getrenntgeschlechtlichen Organismen mit genotypischer Geschlechtsbestimmung der Fall. Es gibt aber auch getrenntgeschlechtliche Formen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung, wie z. B. *Ectocarpus siliculosus* nach Hartmann (1929) und wahrscheinlich auch *Dasycladus clavaeformis* nach Jollos (1926), bei denen sicher zwei verschiedene Stoffe gebildet werden. So läßt sich auf diese Algen die Mainx'sche Theorie nicht anwenden.

Bei *Tetraspora lubrica* ist von Geitler (1931) auch der Nachweis zweier geschlechtsspezifischer Stoffe erbracht worden. Wie mir Herr Dr. L. Geitler mitgeteilt hat, ist es nicht ausgeschlossen, daß die Gruppenbildung in den Zentrifugaten (und Extrakten) bei *Tetraspora* auf Bakterien zurückgeführt werden könnte, da nicht mit absoluten Reinkulturen gearbeitet worden ist. Mit Sicherheit sind nur keine gröberen Verunreinigungen nachgewiesen worden.

Die Erscheinungen der Gruppenbildung und die bei Algen nachgewiesenen „Geschlechtsstoffe" zwingen zu einem Vergleich mit den von Lillie (1912—1924) und Just (1915—1929; Literatur im Sammelreferat von Just, 1930) an Eiern und Spermatozoen von Würmern und Echinodermen festgestellten Befunde. Lillie konnte zeigen, daß die Eier von *Arbacia* und *Nereis* Stoffe ausscheiden, die er Fertilisine nannte. Und zwar ist die Wirkung der Stoffe derart, daß zuerst eine Aktivierung der Spermatozoen erfolgt; dann entsteht eine Aggregation, die durch Chemotaxis zustande kommt und endlich

ist eine Agglutination zu beobachten, die sich von der Aggregation dadurch unterscheidet, daß bei letzterer die Spermatozoen nur locker verbunden sind, während bei der Agglutination die Spermatozoen fest zusammenbacken und durch Schütteln nicht getrennt werden können. Aber auch die Spermatozoen produzieren Stoffe, und nur wenn Eier und Spermatozoen ihre spezifischen Stoffe ausscheiden, ist eine Befruchtung möglich. Werden z. B. Eier im Seewasser mehrmals gewaschen, so wird dadurch das Fertilisin entfernt und die Eier sind nicht mehr befruchtungsfähig. Nur reife Eier scheiden diese Stoffe aus. Die Eigenschaften der Stoffe sind von denen der Algen etwas verschieden; sie können auf 100° C erhitzt werden, ohne ihre Wirksamkeit zu verlieren; sie bleiben auch mehrere Wochen lang wirksam. Ähnlich wie bei den Eiern und Spermatozoen dieser Organismen ist auch bei den Gameten der Algen eine Aktivierung und bestimmt eine Aggregation (Chemotaxis) zu beobachten; ob auch Agglutinationen vorkommen, läßt sich vorläufig nicht sagen, die „Riesenkonglomerate" sprechen eigentlich dafür.

Geschlechtsspezifische Stoffe sind endlich auch von Burgeff (1924) und von Ronsdorf (1931) bei Mucorineen nachgewiesen worden. Chemisch konnten die Stoffe nicht definiert werden. Jedes Mycel, + und —, ist für sich befähigt, eine geschlechtsspezifische Substanz nach außen abzugeben. Beide Stoffe müssen sich nach Ronsdorf irgendwie ergänzen.

Bisher konnte man bei morphologischer Gleichheit der Gameten nur eine physiologische Verschiedenheit angeben, die darin besteht, daß immer nur Gameten verschiedenen Geschlechtes miteinander kopulieren können. Bei genotypischer Geschlechtertrennung wie bei *Chlamydomonas eugametos* wird bei der Reduktionsteilung die Aufspaltung der Geschlechter bewirkt. Es müssen also wenigstens die Gametenkerne eine Verschiedenheit besitzen, wie es allgemein angenommen wird. Bei *Chlamydomonas eugametos* ist nachgewiesen worden, daß jedes Geschlecht einen spezifischen Stoff ausscheidet. Damit sind bei einer isogamen Form (physiologische) Geschlechtscharaktere festgestellt worden. Hierdurch kann auf ganz einfache Weise entschieden werden, ob die Gameten eines Klones zu dem einen oder zu dem anderen Geschlecht gehören. Wir brauchen dazu nicht, wie man es bisher tun mußte, zwei Klone kombinieren und durch das Auftreten von Kopulationon nachweisen, ob die beiden Klone verschiedenen Geschlechtes sind. Sondern wir können bei Nachprüfung der Eigenschaften dieser Stoffe (Bakterienfiltrate), die von einem Klon ausgeschieden werden, direkt schließen und durch

Vergleich mit Stoffen eines anderen Klones im voraus entscheiden, ob bei Kombinationen Kopulationen stattfinden werden oder nicht. Es handelt sich hier um deutliche Geschlechtsmerkmale.

III. *Protosiphon botryoides:* Eine synözische Protococcale mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung.

Protosiphon botryoides ist von Klebs (1896) eingehend untersucht worden. Diese zu den Protococcalen gestellte Alge ist einzellig und vielkernig. Die Zellen sind schlauchförmig, bis zu einem Millimeter lang und vermehren sich durch Teilung oder Sprossung. Unter bestimmten Bedingungen kann es zur Bildung von Cysten kommen. Aus den Cysten wie aus den Zellen können Schwärmer entstehen. Diese wachsen zu normalen Pflanzen heran oder aber sie kopulieren miteinander und bilden sternförmige Zygoten, die nach längerer Ruhezeit keimen und einer neuen *Protosiphon*-Pflanze den Ursprung geben.

1. Kultur.

Für die Untersuchungen stand das in Prag absolut rein kultivierte Material zur Verfügung, das von Herrn Prof. Dr. A. Pascher in Franzensbad gesammelt worden ist. Die Kultur erfolgte in 0,1 proz. Kolkwitz-Nährlösung, in *Volvox*-Lösung, auf 1,5 proz. Agar (aus 0,1 proz. oder 0,05 proz. Kolkwitz-Lösung), auf 0,7 proz. Agar (aus 0,05 proz. Kolkwitz-Lösung). Das beste Nährmedium war 0,7 proz. Agar. Auf diesem werden ca. 1 mm lange Pflanzen ausgebildet. Auf 1,5 proz. Agar bleiben die Zellen klein und neigen zur Cystenbildung. In *Volvox*-Lösung und in Kolkwitz-Nährlösung können auch große Zellen entstehen; aber meist zerfällt der Inhalt frühzeitig in Schwärmer, so daß die Zellen immer sehr klein bleiben. Bei der Kultur an der künstlichen Sonne und am Fenster zeigen sich keine Unterschiede. Für die physiologischen Untersuchungen wurde nur das an der Sonne gezüchtete Material verwendet und selbstverständlich nur absolute Reinkulturen.

2. Morphologie.

Die Angaben von Klebs (1896) können fast in allen Punkten bestätigt werden. Ein einkerniger Schwärmer, der auf Agar gebracht wird, rundet sich ab und bildet so eine kugelige *Protosiphon*-Zelle. Eine solche Kugel von ca. 7 μ Durchmesser, in deren Innern eine Vakuole liegt, hat einen netzförmigen Chromatophoren, der fast die ganze innere Zellwand ausfüllt. Der Chromatophor hat ein Pyrenoid

von ca. 2—3 μ Durchmesser. Im wandständigen Plasma befinden sich zwei Kerne (Fig. 6a). Die Zelle wächst weiter und bleibt zunächst kugelig. Bei einem Durchmesser von ca. 25 μ hat sich auch das Pyrenoid auf 7 μ vergrößert. In Fig. 6b sind 14 Zellkerne zu zählen. Bei weiterem Wachstum teilt sich das Pyrenoid; bei ca. 75 μ großen Zellen sind gewöhnlich 2—3 Pyrenoide vorhanden. Allmählich werden die Zellen ellipsoidisch. Der basale Wurzelteil ist farblos. An einer 55 μ langen und 10 μ breiten Zelle ist ca. die Hälfte farblos. Der netzförmige Chromatophor liegt im apicalen Teil und ist wandständig (Fig. 7a). Später wachsen die Zellen stärker in die Länge; maximal wurden Längen bis zu 1,2 mm gemessen. Solche Zellen (Fig 7b) haben nur im vorderen Teil den wandständigen, netzförmigen Chromatophoren, während alles übrige farblos ist. Im Chromatophoren liegen ungefähr 20—30 Pyrenoide. Oft ist der vordere Abschnitt keulenförmig angeschwollen. Die Breite dieser großen Zellen beträgt durchschnittlich 30—40 μ. Werden solche Zellen mit Rohrzuckerlösung plasmolysiert, so sieht man, wie sich im farblosen Teil eine dünne Plasmaschicht von der Membran abhebt. Von dem abgehobenen Plasma geht eine große Zahl ganz dünner Fäden zur Membran. Der farblose Teil besteht also aus einem dünnen protoplasmatischen Wandbelag und im Innern liegt eine große, die ganze Zelle erfüllende Vakuole. Auf weitere morphologische Einzelheiten soll hier nicht näher eingegangen werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß die Größe des Chromatophoren, die Form der Zellschläuche und das Verhalten der einzelnen Zellen bei der Teilung und bei der Cystenbildung sehr veränderlich sind.

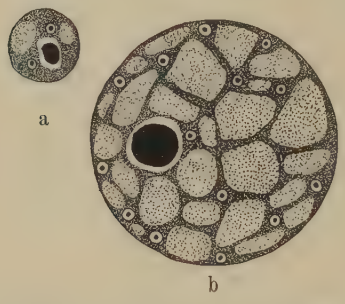

Fig. 6a, b. *Protosiphon botryoides.* a Junge kugelige Zellen mit einem Pyrenoid und zwei Zellkernen (nach einem Kernpräparat). b Etwas ältere Zellen mit großem Pyrenoid und zahlreichen Kernen. (Vergr. 1200 ×.)

Die Zellwand besteht aus reiner Cellulose. Chlorzinkjod gab eine blauviolette Färbung, Jodjodkalium eine gelbbraune und Jod + Schwefelsäure eine tief blaue Farbe der Membran. Klebs war nur die letzte Reaktion gelungen. Verholzung mit Phloroglucin und Pektine mit Safranin lassen sich nicht nachweisen.

Cystenbildung erfolgt bei Temperaturen über 30°, bei Nährsalzmangel, bei Wasserentzug. Je nach der Größe der Zelle werden eine oder mehrere Cysten gebildet. Diese vielkernigen Cysten nehmen

beim Austrocknen eine rote Farbe an. Die speziellen Ergebnisse decken sich vollständig mit Klebs' Angaben, so daß darauf nicht näher eingegangen werden soll.

3. Schwärmerbildung.

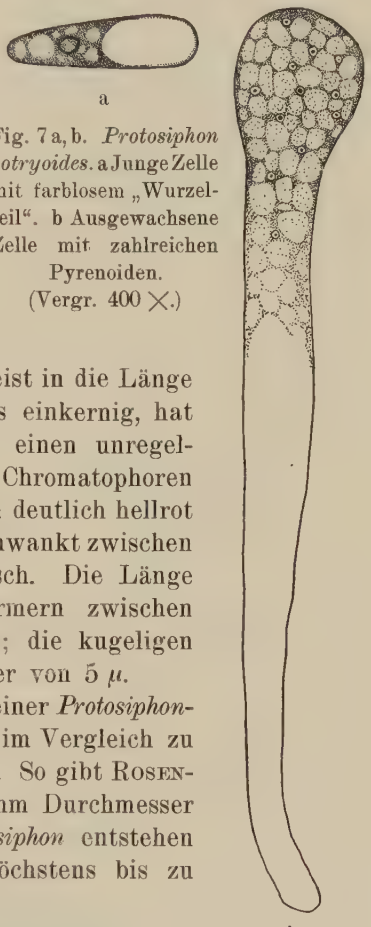

Fig. 7 a, b. *Protosiphon botryoides.* a Junge Zelle mit farblosem „Wurzelteil". b Ausgewachsene Zelle mit zahlreichen Pyrenoiden. (Vergr. 400 ×.)

Der Vorgang der Schwärmerbildung ist von Klebs genau beschrieben worden. Es handelt sich um Zerfall des Plasmas; der Chromatophor wird zuerst undeutlich, bis schließlich gleichzeitig eine große Zahl von Plasmaportionen sichtbar wird. Diese Teilchen runden sich ab und erhalten Geißeln. Die Schwärmer bewegen sich bereits in der Zelle umher und strecken sich meist in die Länge (Fig. 8 a, b). Der Schwärmer ist stets einkernig, hat zwei ungefähr körperlange Geißeln, einen unregelmäßig ausgebildeten wandständigen Chromatophoren und meist in der vorderen Hälfte einen deutlich hellrot gefärbten Augenfleck. Die Zellform schwankt zwischen kugelig (Fig. 8 c) bis lang ellipsoidisch. Die Länge variiert bei ellipsoidischen Schwärmern zwischen 7—11 μ, die Breite zwischen 3—5 μ; die kugeligen Zellen haben meist einen Durchmesser von 5 μ.

Die Zahl der Schwärmer, die aus einer *Protosiphon*-Pflanze hervorgehen, ist sehr gering im Vergleich zu den Mengen bei *Botrydium granulatum.* So gibt Rosenberg (1930) für eine Blase von 1 mm Durchmesser ca. 40000 Schwärmer an. Bei *Protosiphon* entstehen aus einer ca. 300 μ langen Zelle höchstens bis zu 100 Schwärmer.

Über die Physiologie der Schwärmerbildung vergleiche man die ausführliche Darstellung bei Klebs. Er fand, daß mit steigender Temperatur die Zeitdauer der Schwärmerbildung immer geringer wurde, bis bei 23—26° ein Optimum erreicht wurde ($2^1/_2$—3 Stunden). Es handelte sich da um Zellen aus Lehmkulturen, die in Wasser gebracht und verdunkelt wurden. Die Zellen, die hier für diese Versuche verwendet worden sind, sind auf Agar (0,7 proz.) gewachsen. Die Versuche wurden mit verschieden alten (1—8 Wochen) Kulturen ausgeführt, ohne daß sich Unterschiede

zeigten. Die Zellen wurden vom Agar in destilliertes Wasser, in Leitungswasser, in 1 proz. Sorbit, in *Volvox*-Lösung und in 1 proz. Kolkwitz-Nährlösung gebracht; alle Versuche wurden bei Beleuchtung an der künstlichen Sonne und im Dunkeln ausgeführt. Zwischen Licht- und Dunkelversuchen ergaben sich keine Unterschiede. Es war gleichgültig, ob die Versuche vormittags kurz nach Beginn der Beleuchtung der Kulturen an der Sonne oder nachmittags, abends oder nachts angesetzt wurden. Geprüft wurden Temperaturen von + 2, 4—5, 7, 10, 16, 21, 25, 26, 28, 30, 34°. Bei Temperaturen von 5° und darunter, wie bei 30° und höher werden keine Schwärmer gebildet. Dagegen läßt sich in allen obenerwähnten Lösungen, sowohl im Licht wie im Dunkeln bei Kulturen jeden Alters zu jeder Tages- und Nachtzeit bei Temperaturen zwischen 7 und 28° innerhalb von 4—5 Stunden Schwärmerbildung hervorrufen. Bei 7° erfolgt die Bildung ebenso schnell wie bei 21° oder wie bei Klebs' Optimum von 23—26°, wenn die Zellen vorher bei Zimmertemperatur kultiviert werden.

4. Kopulationsbedingungen.

Klebs ist zu dem Schluß gekommen, daß „eine Temperatur von 25—27° den Schwärmern in ihren letzten Bildungsstadien die Kopulationsfähigkeit nimmt". Bei 25—27° fanden keine Kopulationen statt. In meinen Versuchen zeigte sich, daß alle Schwärmer zwischen 2 und 28° im Licht wie im Dunkeln kopulieren können. Die Dunkelversuche wurden erst nach 2 Tagen beobachtet, als bereits fertige Zygoten gebildet waren, da schon das Licht bei der mikroskopischen Beobachtung genügen würde, um die Schwärmer zur Kopulation zu bringen. Kopulationen finden in allen obenerwähnten Lösungen statt, also in destilliertem Wasser, in Leitungswasser, in 1 proz. Sorbit, in *Volvox*-Lösung, in 1 proz. Kolkwitz-Lösung. Trotzdem die Nährsalzkonzentration des Agars weniger als 0,05 Proz. betragen hat, kopulieren die Schwärmer in 1 proz. Kolkwitz-Lösung, also nach Überführung in eine 20 mal höhere Konzentration. Nach Klebs' Angaben würden bei solchen Versuchen niemals Kopulationen stattfinden. An dieser Stelle muß noch darauf hingewiesen werden, daß die Schwärmer nur bei Temperaturen über 7° gebildet werden; Kopulationen finden aber bereits von 2° ab statt. Das zeigt hier in diesem Fall, daß die Gametenbildungsbedingungen nicht mit den Kopulationsbedingungen übereinzustimmen brauchen. Mainx (1931) führt diese Trennung bei den *Oedogonium*-Arten nicht durch. Es sind aber zwei verschiedene Vorgänge, die Bildung der Geschlechtszellen und die

Kopulation selbst, und die Bedingungen für den Eintritt beider sind nicht immer dieselben.

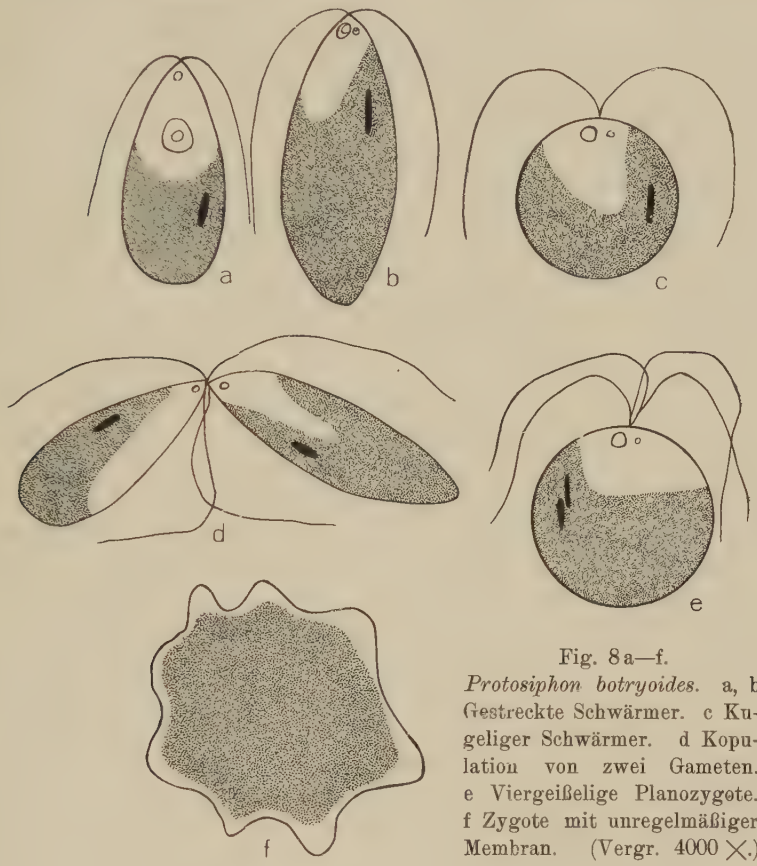

Fig. 8 a—f.
Protosiphon botryoides. a, b Gestreckte Schwärmer. c Kugeliger Schwärmer. d Kopulation von zwei Gameten. e Viergeißelige Planozygote. f Zygote mit unregelmäßiger Membran. (Vergr. 4000 ×.)

5. Kopulationsverlauf.

Hierüber ist nichts Neues mitzuteilen. Zwei Gameten berühren sich mit den vorderen Enden und verschlingen sich mit den Geißeln (Fig. 8 d). Dann erfolgt das Umkippen zur Seite und es entsteht die viergeißelige Planozygote (Fig. 8 e), die sehr bald zur Ruhe kommt. Die Zygote bildet eine stachelige Membran aus (Fig. 8 f).

6. Geschlechtsdifferenzierung.

Klebs (1896) gibt p. 213 an, daß „die Schwärmer der gleichen Mutterzelle nicht miteinander kopulieren". Weder innerhalb der Zelle, in der sich die Schwärmer lebhaft umherbewegen, noch nach

ihrem Freiwerden wurden von ihm Kopulationen beobachtet. Stets kamen sie zur Ruhe und bildeten glatte Sporen (= Cysten). Es können aber auch Ausnahmen vorkommen. So schreibt er p. 217, daß „in seltenen Fällen in lang schlauchförmigen Zellen, die vorher in zahlreiche Sporen (= Cysten) zerfallen waren, vereinzelt Sternsporen (= Zygoten)“ auftraten. Es heißt dann weiter, „wahrscheinlich hatten Gameten verschiedener Sporen der gleichen Mutterzelle kopuliert“. Nach Carter (1926; p. 682, Anmerkung) können Gameten manchmal innerhalb der Mutterhülle kopulieren und sternförmige Zygoten bilden.

Aus diesen Angaben ist aber nicht zu entnehmen, ob phänotypische oder genotypische Geschlechtsbestimmung vorliegt und ob *Protosiphon* gemischtgeschlechtlich (synözisch) oder getrenntgeschlechtlich (heterözisch) ist. Diese Fragen lassen sich nur an Klonen entscheiden, bzw. an einzelnen Zellen eines Klones, und wurden durch folgende Versuche geklärt: Es wurden 15 einkernige Schwärmer auf Agar isoliert. In allen 15 Klonkulturen, die später aus zahlreichen kleinen Zellen bestanden, traten nach einiger Zeit Zygoten auf. Damit war phänotypische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen. Es haben Gameten, die aus Zellen von Abkömmlingen eines Schwärmers entstanden waren, miteinander kopuliert.

Um festzustellen, ob Synözie oder Heterözie vorliegt, wurden große Zellen eines Klones isoliert. So wurden 14 Zellen auf hohlgeschliffenen Objektträgern, die in eine feuchte Kammer gestellt wurden, in destilliertem Wasser zur Gametenbildung gebracht. Dabei kopulierten in allen 14 Fällen die aus einer Zelle hervorgegangenen Gameten miteinander. Damit ist der Nachweis erbracht, daß *Protosiphon botryoides* synözisch ist.

Wenn nach Klebs die Gameten aus einer Zelle nicht kopuliert haben, so ist das wahrscheinlich auf kopulationshemmende Einflüsse zurückzuführen, die bei Arbeiten in feuchten Kammern sehr leicht auftreten können.

Die übriggebliebenen Gameten bei den letzten Versuchen kommen nach einiger Zeit zur Ruhe und wachsen sofort, ohne Ruhezeit, zu einer neuen *Protosiphon*-Pflanze heran. Die zur Ruhe gekommenen nicht kopulierten Gameten sind immer kugelig, während die Zygoten in allen Fällen sternförmig sind. So war es leicht, diese Parthenosporen zu isolieren. Es wurden zehn solcher kugeligen Zellen auf 0,7 Proz. Agar gebracht, auf dem sie bald wieder eine normale schlauchförmige *Protosiphon*-Pflanze gebildet hatten. Eine aus einer Parthenospore gebildete Zelle wurde wiederum in destilliertem Wasser

zur Gametenbildung gebracht. Es kopulierten hier die Gameten einer Zelle miteinander, also wieder ein Beweis für die Synözie und phänotypische Geschlechtsbestimmung.

Aus diesen Versuchen geht nicht hervor, ob *Protosiphon botryoides* ein Haplont oder ein Diplont ist. Die Annahme liegt natürlich nahe, daß es sich um einen Haplonten handelt, die Reduktionsteilung daher nicht bei der Gametenbildung, sondern bei der Zygotenkeimung erfolgen wird. Denn es müßte, wenn *Protosiphon* ein Diplont wäre, während des Wachstums einer einkernigen Parthenospore, die mit absoluter Sicherheit haploid ist, eine Aufregulierung zur diploiden Chromosomenzahl stattgefunden haben. Begründet ist die Annahme eines so komplizierten Vorganges nicht. Die endgültige Entscheidung kann nur die cytologische Untersuchung bringen.

7. Gruppenbildung.

Klebs (1896, p. 207) schreibt: „Kaum aus den Zellen ausgetreten, ziehen sich die Schwärmer lebhaft an, stürzen aufeinander zu, wobei oft Gruppen von sechs und mehr Schwärmern entstehen, die sich dann wieder auflösen, wenn je zwei Schwärmer sich verbunden haben."

In gutem vegetativen Zustand befindliche *Protosiphon*-Zellen (alle ca. 1 mm lang), mit keulig angeschwollenen Enden, wurden in destilliertes Wasser gebracht. Es wurden gleichzeitig zehn Boveri-Schalen angesetzt. In jede kamen Tausende von Zellen. Die Schalen standen 1 m vom Fenster bei trübem Wetter; die Temperatur betrug 19—20°. Die Versuche wurden um 9 Uhr angesetzt. Nach 5 Stunden waren bereits Schwärmer gebildet, die nach dem Freiwerden sofort oder in Ausnahmefällen erst nach einer Stunde kopulierten; es entstanden hierbei meist 10—20zellige Gruppen, ähnlich wie bei *Chlamydomonas eugametos*. Zwei Gameten verschlingen sich mit ihren Geißeln, andere kommen hinzu, einzelne schwimmen wieder weg; in der Gruppe fangen andere an zu kopulieren, so daß also aus einer Gruppe mehrere Paare hervorgehen. Die Gruppen sind dauernd in Bewegung; es setzt sich kein Gamet fest.

8. Restgameten.

Nachdem 2 Stunden lang Kopulationen stattgefunden haben, sieht man am Lichtrand sehr viele Schwärmer angesammelt, die nicht miteinander kopulieren. Die Planozygoten liegen am Boden des Kulturgefäßes. Mit Jodalkohol konnten am Lichtrand nur zweigeißelige Schwärmer nachgewiesen werden. Diese Schwärmer würden,

wenn sie zur Ruhe gekommen sind, zu neuen *Protosiphon*-Pflanzen heranwachsen.

Die Restgameten bleiben ca. 15 Stunden lang beweglich. In dieser Zeit wurden die Restgameten verschiedener Schalen miteinander kombiniert. Die mit der Pipette entnommenen Tropfen wurden jedesmal mikroskopisch daraufhin geprüft, ob keine Kopulationen mehr stattfinden und ob keine Zygoten darin sind. Das Ergebnis zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10.

Protosiphon botryoides. Kombination von Restgameten aus zehn Schalen. Die Restgameten aus sechs Schalen gehören dem einen, die von vier Schalen dem anderen Geschlecht an.

	1	2	4	5	6	7	3	8	9	10
1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
2	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
4	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
5	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
6	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
7	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
8	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
9	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
10	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

Alle 45 möglichen Kombinationen wurden dreimal (Beginn der Kopulation 14^h, Ende 17^h; 1. Kombination 18^h; 2. Kombinatiou 20^h; 3. Kombination am anderen Tage 8^h) ausgeführt; es zeigte sich eine strenge Getrenntgeschlechtlichkeit. Die Restgameten von Schale 1, 2, 4, 5, 6, 7 gehörten dem einen, die von 3, 8, 9, 10 dem anderen Geschlecht an. Es war also möglich, durch diese Kombinationen von neuem Kopulationen hervorzurufen. Die positiven und die negativen Reaktionen wurden nicht nur aus beobachteten Kopulationen und Gruppenbildungen geschlossen, sondern noch durch das Auftreten oder Fehlen von Zygoten gesichert. Die Objektträger kamen in eine feuchte Kammer und 2 Tage später wurde festgestellt, wo Zygoten gebildet waren und wo nicht. Die Ergebnisse stimmten mit den Kopulationsbefunden überein.

Weiter wurden acht große Zellen isoliert und auf hohlgeschliffenen Objektträgern in destilliertem Wasser zur Gametenbildung gebracht. Die Restgameten der acht Zellen wurden miteinander kombiniert. Es stellte sich heraus, daß die Restgameten von Zelle 1, 2, 4, 7, 8 dem einen und die von 3, 5, 6 dem anderen Geschlecht angehörten, also auch hier eine deutliche Bipolarität (Tabelle 11).

Tabelle 11.

Protosiphon botryoides. Kombination der Restgameten von acht einzelnen Zellen

	1	2	4	7	8	3	5	6
1	—	—	—	—	—	+	+	+
2	—	—	—	—	—	+	+	+
4	—	—	—	—	—	+	+	+
7	—	—	—	—	—	+	+	+
8	—	—	—	—	—	+	+	+
3	+	+	+	+	+	—	—	—
5	+	+	+	+	+	—	—	—
6	+	+	+	+	+	—	—	—

Es kann also einmal das eine, ein anderes Mal das andere Geschlecht übrig bleiben. Trotz phänotypischer Geschlechtsbestimmung und trotz Gemischtgeschlechtlichkeit ist eine ganz klare Bipolarität zu erkennen. Auf die Bedeutung dieser Resultate für den Beweis der von Hartmann (1929) vertretenen Anschauungen soll nach Mitteilung der Ergebnisse über „Geschlechtsstoffe" eingegangen werden.

Genau dasselbe Verhalten zeigt *Acetabularia mediterranea. Acatabularia* ist nach umfangreichen Versuchen Hämmerling's — unveröffentlicht — häufig gemischtgeschlechtlich. Läßt man die Gameten eines Individuums auskopulieren, so bleibt auch hier ein Rest übrig, der stets nur zu einem Geschlecht, dem + oder — gehört, was durch entsprechende Kombinationen sichergestellt werden konnte. *Acetabularia* ist also in solchen Fällen „andro- oder gynosynöcisch". Auf diesen von Hämmerling gemachten Befunden basiert das hier geschilderte analoge Experiment.

9. „Geschlechtsstoffe".

Nachdem auch bei *Protosiphon* zwei Geschlechter nachgewiesen wurden, lag es nahe zu untersuchen, ob jedes Geschlecht einen spezifischen Stoff ausscheiden würde und ob dadurch die Anlockung der Gameten erklärt werden könnte. Die Versuche mit *Protosiphon* wurden nicht mit derselben Ausführlichkeit durchgeführt wie mit *Chlamydomonas eugametos*, da die Ergebnisse fast identisch sind und wir durch diese Versuche an die Chemie dieser Stoffe wie an das Wesen der Sexualität nicht herankommen.

+-Filtrate wurden aus Kultur 1, 2, 4, 5, 6 und 7, —-Filtrate aus Kultur 3, 8, 9 und 10 hergestellt. Werden zu den Filtraten Gameten desselben oder des anderen Geschlechtes gegeben, so findet keine Reaktion, d. h. keine Kopulationen und auch keine Gruppenbildung statt. Auch die verschieden lange (2—18 Std.) Einwirkung

z. B. eines +-Filtrates auf —-Gameten und darauffolgendes Zugeben von unbehandelten - -Gameten ergibt keine Reaktion. Eine Umstimmung läßt sich also nicht erzielen. Gibt man aber zu einem +-Filtrat Bakterien, läßt diese mindestens 30 Minuten lang darin und fügt darauf —-Gameten hinzu, so treten nach einer Sekunde Gruppenbildungen auf, jedoch keine Kopulationen. Dasselbe mit —-Filtraten, Bakterien und +-Gameten. Setzt man nach der Bakterienbehandlung dasselbe Geschlecht zu, aus dem das Filtrat hergestellt worden ist, so ist keine Gruppenbildung zu beobachten. Ebenso gibt eine einfache Bakterienaufschwemmung mit +- oder —-Gameten keine Reaktion. Werden diese Filtrate 5 Minuten lang auf 60° erwärmt, so sind sie unwirksam. Nach 12 Stunden haben die Filtrate keine Wirksamkeit mehr. Die Filtrate gefrieren wie die Nährlösungen bei —10°.

Bei dieser gemischtgeschlechtlichen Alge mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung werden also zwei verschiedene geschlechtsspezifische Stoffe ausgeschieden, durch welche die Anlockung und Gruppenbildung zu erklären ist. Damit sind auch für diese Form bei den Gameten (physiologische) Geschlechtscharaktere (= geschlechtsspezifische Stoffe) nachgewiesen worden. Ein ganz klarer Beweis, daß auch bei gemischtgeschlechtlichen Organismen zwei deutlich unterschiedene Geschlechter vorhanden sind.

10. Zusammenfassung.

Während bei getrenntgeschlechtlichen Organismen mit phänotypischer wie mit genotypischer Geschlechtsbestimmung nicht daran zu zweifeln ist, daß zwei deutlich unterschiedene Geschlechter vorhanden sind, sind bei gemischtgeschlechtlichen Organismen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung in letzter Zeit von verschiedenen Forschern wie Czurda (1929), Kusano (1930), Mainx (1931), Pascher (1931) Zweifel daran aufgetaucht, so daß Pascher (1931) folgenden Satz aufstellt: „Ja, es erhebt sich die Frage, ob die übliche Grundvorstellung von der Zweigeschlechtigkeit notwendig ist.“ Mainx (1931) bezeichnet die Annahme der Bipolarität bei solchen Organismen als „nicht nur überflüssig, sondern sogar gezwungen und irreführend“. Auch Czurda kommt zu dem Schluß, daß bei Zygnemalen die Bipolarität abzulehnen ist, da sie von höheren Organismen abgeleitet worden ist.

Von Hartmann (1927, 1929) sind die Begriffe phänotypische und genotypische Geschlechtsbestimmung streng definiert worden. „Als phänotypische Geschlechtsbestimmung bezeichnen wir den Modus,

bei dem dieselbe nicht erblich (genotypisch) durch die Reduktionsteilung (und Befruchtung) zustande kommt, sondern bei dem sie durch äußere und innere Bedingungen während des vegetativen Lebens der Organismen ausgelöst wird, indem sich einzelne oder mehrere Zellen des indifferenten doppelgeschlechtlichen Organismus in „männliche“ und „weibliche“ Zellen aufteilen.“

Bei *Protosiphon* handelt es sich um phänotypische Geschlechtsbestimmung eines Haplonten (also mit zygotischer Reduktion). Durch die oben beschriebenen Versuche ist aber gezeigt worden, daß bei dieser Art immer zwei deutlich unterschiedene Geschlechter vorhanden sind; es herrscht also eine strenge Bipolarität. Kusano, Czurda, Mainx und Pascher bezweifeln das Vorkommen einer Zweigeschlechtlichkeit; ihre Vermutungen gründen sich außer denen von Czurda auf Beobachtungen bei der Gruppenbildung. Mainx (1931) entwickelte eine reizphysiologische Vorstellung, der sich Pascher angeschlossen hat und die hier ganz kurz wiedergegeben werden soll, obgleich sie durch den Nachweis der Bipolarität hinfällig geworden ist. Mainx erhielt seine Resultate an *Hydrodictyon reticulatum*, einem gemischtgeschlechtlichen Organismus mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung. Er nimmt an, daß die Anlockung der Gameten nur in einer chemotaktischen Wirkung des einen Schwärmers auf den anderen beruhe, dabei aber nur ein Stoff ausgeschieden werde; zwei verschiedene Stoffe anzunehmen, wäre nach Mainx viel komplizierter und unwahrscheinlich. Damit eine Anlockung zustande kommt, muß der eine Gamet das Chemotaktikum ausscheiden, der andere nicht oder in weit geringerem Maße als der erste. Es wird der Zustand der „Reife“ von Gameten eingeführt. Die Gameten in „voller Reife“ sind die das Chemotaktikum maximal ausscheidenden, die anderen Gameten die davon angelockten. Im Laufe der Zeit müssen immer mehr Gameten in den Zustand der „vollen Reife“ übergehen, da alle Gameten die gleiche Entwicklung durchmachen. Zum Schluß bleiben nur die „vollreifen“ Gameten übrig, die nicht miteinander kopulieren können. Daß Gameten also übrigbleiben, ist bereits von Mainx beobachtet worden, nur müssen sie nach ihm in allen Fällen vom gleichen „Geschlecht“, „vollreif“ sein. Das ist aber bei *Protosiphon* nicht der Fall. Es können einmal Gameten des einen Geschlechtes übrigbleiben und in einer anderen Kultur Gameten des anderen Geschlechtes. Der Beweis folgt daraus, daß bei Kombination von Restgameten verschiedener Kulturen eine strenge Bipolarität erhalten wird. Auch bei *Hydrodictyon* hätte eine Kombination der Restgameten verschiedener Kulturen wahrscheinlich

eine deutliche Zweigeschlechtlichkeit ergeben; jedoch sind von Mainx diese Versuche nicht ausgeführt worden. Wie bereits Hartmann (1932) mitgeteilt hat, hat inzwischen Frl. Dr. M. Rosenberg nachgewiesen, daß bei *Hydrodictyon* die Restgameten von sieben Kulturen entweder +- oder —-Gameten waren; die Restgameten von drei Schalen gehörten dem einen Geschlecht, die von den vier anderen dem entgegengesetzten an.

Bei *Chlamydomonas paupera* nach Pascher (1931), bei *Synchytrium fulgens* nach Kusano (1930) und bei *Synchytrium endobioticum* nach Köhler (1930) kommen bei der Gruppenbildung einzelne Gameten zur Ruhe, die dann als Anlockungszentren auf andere, umherschwimmende Gameten wirken. Pascher gibt für seine Chlamydomonade eine ähnliche Erklärung wie Mainx, ebenso Kusano, so daß dann alle diese Erscheinungen nach der Mainx'schen Vorstellung zustande kommen sollen. Da nun durch die Versuche an *Protosiphon* die Mainx'sche Anschauung widerlegt worden ist, fallen auch die Erklärungsversuche der anderen Forscher. Es muß noch auf einen Punkt hingewiesen werden. Pascher hat bei *Chlamydomonas paupera* festgestellt, daß unter den angelockten Gameten auch später einige zur Ruhe kommen und so neue Anlockungszentren werden. Er bezeichnet diesen Vorgang als „Geschlechtswechsel". Ähnliches beobachtete auch Kusano an der *Synchytrium*-Art. Doch lassen sich diese Erscheinungen einfacher deuten. Es ist bekannt, daß aus den Gruppen von *Chlamydomonas eugametos*, von *Protosiphon botryoides*, von *Hydrodictyon reticulatum*, von *Enteromorpha*- und *Ulva*-Arten zahlreiche Paare hervorgehen; es müssen also in einer Gruppe beide Geschlechter vorhanden sein; das ist auch bei der Pascher'schen *Chlamydomonas* und den *Synchytrium*-Arten der Fall. Nur mag es bei diesen Formen so sein, daß das eine Geschlecht in Überzahl in einer Gruppe auftritt. Daß nun in einer Gruppe der eine Gamet erst später zur Ruhe kommt, das ist kein „Geschlechtswechsel", sondern einfach Ausdruck eines physiologischen Zustandes des Gameten. Manchmal kommt es nach Pascher vor, daß sofort viele Gameten zur Ruhe kommen und nur kleine Gruppen entstehen. Es tritt aber auch ein, daß nur sehr wenige unbeweglich werden und dann zuerst große Gruppen entstehen. Dann ist eben das eine Geschlecht noch nicht kopulationsfähig; es scheidet noch nicht Stoffe ab. Bei diesem Entwicklungsprozeß werden einige Gameten zuerst den Stoff abscheiden. Doch ist noch gar nicht gesagt, welcher Gamet beim zweiten Mal zur Ruhe kommt. Es könnte das andere Geschlecht sein. Hier können nur Vitalfärbungen und das Verhalten der Rest-

gameten Aufklärung bringen. Diese allein entscheidenden Experimente sind aber weder bei *Chlamydomonas paupera*, noch bei *Synchytrium*-Arten durchgeführt worden. Solange sie fehlen, können sie niemals als Beweise gegen eine Bipolarität herangezogen werden.

Nach Mitteilung von Herrn Prof. Hartmann — unveröffentlicht — kopulieren die Gameten von *Ectocarpus siliculosus* gewöhnlich am frühen Vormittag. Dieselbe Pflanze kann 5—6 Wochen hindurch alle paar Tage Gameten entleeren, die immer wieder sofort gut reaktionsfähig sind. Es kann jedoch vorkommen, daß die Gameten morgens zunächst nicht kopulationsfähig sind und es erst später werden. Worauf solche Hemmungen zurückzuführen sind, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis. Es ist leicht möglich, daß auch bei den Versuchen von Kusano, Köhler und Pascher aus unbekannten Gründen solche „Störungen" auftraten. So kopulieren auch bei *Protosiphon* die gerade freigewordenen Gameten entweder sofort miteinander oder in seltenen Fällen erst nach einigen Stunden. Ebenso sind nach Matnx die Gameten von *Hydrodictyon* 5—48 Stunden lang indifferent.

IV. *Stephanosphaera pluvialis*: Eine synözische Volvocale mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung.

Stephanosphaera pluvialis ist eine koloniebildende Volvocale. Innerhalb einer Gallerthülle liegen acht langgestreckte Zellen, die je zwei Geißeln nach außen senden. *Stephanosphaera* ist von Cohn (1853), Cohn und Wichura (1857), Hieronymus (1887), Schulze (1927) und Strehlow (1929) untersucht worden.

1. Kultur.

Schulze (1927) kultivierte *Stephanosphaera pluvialis* in Faulkulturen mit wenig Pepton (0,025 Proz.). Auch Uspenski- und Knop-Nährlösung waren geeignet. Manche Mißerfolge waren vielleicht darauf zurückzuführen, daß nicht mit absoluten Reinkulturen gearbeitet wurde.

Stephanosphaera wurde in den verschiedensten Nährlösungen gezüchtet: in Benecke-, Knop-, Kolkwitz-Nährlösung (0,01—0,1 Proz.), in *Volvox*-Lösung. Die Entwicklung war in allen Medien gleich gut. Es ist gelungen von dieser Form absolute Reinkulturen zu erhalten. Stark angereichertes Material wurde mehrmals mit sterilem Wasser durch phototaktische Ansammlung gereinigt. Zur Nachprüfung wurden nach einiger Zeit in *Volvox*-Lösung kultivierte Kolonien in Nährbouillon (Pepton, Fleischextrakt usw.) gegeben; es entwickelten sich

darin keine Bakterien. Nur durch absolute Reinkulturen war es möglich, diese Untersuchungen auszuführen. Die Kultur erfolgte in Erlenmeyer-Kolben (100 ccm) oder in Boveri-Schalen (beide aus Jenaer Glas) an der künstlichen Sonne. Bei Verwendung von Glasgeräten aus anderem als Jenaer Glas traten oft Störungen auf; manche Kulturen entwickelten sich z. B. in Esmarch-Schälchen trotz sorgfältigster Reinigung überhaupt nicht.

Die Kulturen in den obenerwähnten Lösungen müssen alle 2—3 Wochen neu übertragen werden, da nach dieser Zeit Gametenbildung einsetzt. Um die Form längere Zeit in derselben Nährlösung zu kultivieren, wurden Versuche mit höher prozentigen Lösungen angestellt. Aber die Kolonien vermehren sich z. B. in einer 1 proz. Lösung sehr schlecht. Man kann sie darin mehrere Monate halten. Nach einiger Zeit (ca. 3 Monate) setzt eine Periode besseren Wachstums ein. Die Kulturen werden dicht grün und etwa 2 Wochen später werden Gameten gebildet. In der 1 proz. Lösung war zuerst die Vermehrungsintensität herabgesetzt, nur langsam wurde die Salzkonzentration geringer, bis schließlich optimale Werte erreicht wurden (um 0,1 Proz.). Darin vermehren sich die Kolonien sehr intensiv und bald danach, wenn die Nährsalze erschöpft sind, werden Gameten gebildet.

2. Kopulationsverlauf und Geschlechtsdifferenzierung.

Der Kopulationsverlauf ist von Hieronymus (1887) beschrieben und abgebildet worden. Die Gameten entstehen nach ihm zu 16 bis 32 aus einer Zelle, selten mehr. An dem hier untersuchten Material werden aus einer Zelle in den meisten Fällen 64 Gameten gebildet, so daß aus einer 8zelligen Kolonie 512 Gameten hervorgehen.

Wie an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt werden soll, ist die Chromosomenzahl 10, auch bei der Gametenbildung bleibt sie erhalten; nur die Zygote ist diploid und bei deren Keimung findet die Reduktionsteilung statt, wie an Hand zahlreicher Stadien nachgewiesen werden kann.

Über den Kopulationsverlauf der spindelförmigen Gameten ist gegenüber den Angaben von Hieronymus (1887) nichts nachzutragen. Die Dauer der Kopulation der Gameten beträgt 30—60 Minuten. Schulze (1927) hat phänotypische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen: es kopulieren Gameten, die innerhalb eines Klones gebildet werden. Weiter ist von ihm festgestellt worden, daß *Stephanosphaera* gemischtgeschlechtlich (synözisch) ist; die Gameten, die von

einer einzigen Zelle einer Kolonie entstanden sind, kopulieren miteinander.

Die Beobachtungen von Schulze konnten bestätigt werden. *Stephanosphaera pluvialis* ist eine gemischtgeschlechtliche Alge mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung.

3. Gametenbildungsbedingungen.

Schulze (1927) hat die Lebensdauer von *Stephanosphaera*-Kolonien bei verschiedenem p_H geprüft. Dazu verwendete er Verdünnungen von n/1000 HCl und n/100 NaOH. Bei diesen Versuchen trat regelmäßig Gametenbildung ein und zwar bei p_H-Werten von 4,3 6,0 7,1 7,9 8,9 nach 40 Stunden, bei p_H von 10,4 bereits nach 14 Stunden. Gametenbildung erfolgte nach Schulze bei Anreicherung von Kolonien im beengten Raum durch Übertragung in nährstoffarme Medien. Bei den p_H-Versuchen, die Schulze angestellt hat, treten Gameten innerhalb eines Bereiches von 4,3—10,4 auf. Die Kulturen, aus denen die Kolonien entnommen wurden, hatten ein p_H von 7. Die Gametenbildung ist wahrscheinlich durch die Überführung in destilliertes Wasser verursacht worden.

Mit *Stephanosphaera* sind folgende Versuche durchgeführt worden:

I. p_H-Änderung.

Die Kultur der Kolonien erfolgt in *Volvox*-Lösung p_H 4,3 7 10,4. In diesen Lösungen war die Entwicklung der Kolonien gleich gut. Nach zweimaliger Übertragung, also nach einer Kultur von 6 Wochen in der betreffenden Lösung wurden die Kolonien in *Volvox*-Lösungen übertragen, deren p_H von 3,2—11,5 variiert wurde. In gleicher Weise wurden Kolonien in Kolkwitz-Lösung von p_H 4,5 8 und 10,5 kultiviert; in allen drei Lösungen war die Entwicklung sehr gut. Dann wurden die Kolonien in Kolkwitz-Lösungen übertragen, deren p_H zwischen 3,5 und 11,3 variiert wurde. Es trat niemals Gametenbildung auf. Es war gleichgültig, ob die Kolonien aus einer gerade übergeimpften Ausgangskultur, aus einer 8 Tage alten oder aus einer 14 Tage alten Kultur stammten. Bei längerem Aufenthalt in der Kulturlösung treten infolge Nahrungsmangel Gameten auf.

Diese Versuche zeigen also, daß eine plötzliche Änderung des p_H bei gleichbleibender Nährlösung keine Gametenbildung hervorzurufen vermag.

In alten Kulturen ($2^1/_2$ Wochen und mehr) tritt in *Volvox*-Lösungen und in Kolkwitz-Lösungen Gametenbildung ein. Doch ist das bei *Stephanosphaera* nicht auf eine p_H-Änderung zurückzuführen

wie zahlreiche p_H-Messungen ergaben. So ist z. B. in einer frischen KOLKWITZ-Lösung der p_H-Wert 8, in alten Kulturen, die in Gametenbildung übergehen, wurde derselbe p_H-Wert gefunden.

II. Nährsalzmangel.

Kultur in *Volvox*-Lösung. Die Verdünnungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Alter der Kulturen 2 Tage, 8 Tage, 14 Tage. Verdünnungen $0, 1/2, \ldots 1/100$, aq. dest.; gleichzeitig bei verschiedenem p_H. Kultur in 0,1 proz. KOLKWITZ-Lösung. Alter der

Tabelle 12.

Stephanosphaera pluvialis. Gametenbildung durch Nährsalzmangel bei verschiedenem p_H und verschiedener Kultur.

Kultur in	Übertragung in		p_H 3,5	4,3	5,8	7,0	8,3	9,8	10,8
Volvox-Lösung $\frac{p_H}{7}$	*Volvox*-Lösung	1:1	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1:2	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1:4	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1:10	—	+	+	+	+	+	+
—	—	1:25	—	+	+	+	+	+	+
—	—	1:50	—	+	+	+	+	+	+
—	—	1:100	—	+	+	+	+	+	+
—	aq. dest.		—	+	+	+	+	+	+
KOLKWITZ 0,1	KOLKWITZ-Lösung	0,1	—	—	—	—	—	—	—
—	—	0,05	—	—	—	—	—	—	—
—	—	0,01	—	+	+	+	+	+	+
—	aq. dest.		—	+	+	+	+	+	+

Kultur 7 Tage. Diese beiden Versuchsserien (Tabelle 12) zeigen, daß einfach der Nährsalzmangel durch Verringerung der Konzentration des Nährmediums die Gametenbildung hervorruft. Der p_H-Wert ist gleichgültig, solange die Kolonien überhaupt lebensfähig sind. Ob der Entzug bestimmter Salze die Bildung der Gameten hervorrufen würde, wurde nicht untersucht. Bei diesen Versuchen wurde Licht und Temperatur konstant gehalten (künstliche Sonne, $t = 19—20^0$ C).

Werden *Stephanosphaera*-Kolonien aus *Volvox*-Lösung oder aus 0,1 proz. KOLKWITZ-Lösung in 0,01—1 proz. Zuckerlösungen übertragen, so findet Gametenbildung statt. Mehr als 1 proz. Lösungen wirken hemmend; Sorbitlösungen ergeben dieselben Resultate, nur mit dem Unterschied, daß auch in einer 2,5 proz. Sorbitlösung noch Gameten gebildet werden. Glykokoll hemmt bereits in einer 0,2 proz. Lösung die Gametenbildung. In 0,1 und geringer prozentigen Lösungen werden dagegen Gameten gebildet.

III. Licht und Temperatur.

Werden die Nährsalzmangelversuche im Dunkeln angesetzt, so werden wie im Licht immer Gameten gebildet, wie bei Tabelle 13. Auch in den organischen Substanzen findet im Dunkeln Gametenbildung statt. Gameten treten bei Temperaturen zwischen +2—32° C auf, wenn die Kolonien aus *Volvox*-Lösung in destilliertes Wasser übertragen werden. Weitere Versuche wurden nicht ausgeführt.

4. Kopulationsbedingungen.

Es ist bereits bei *Protosiphon* darauf hingewiesen worden, daß zwischen Gametenbildungsbedingungen und Kopulationsbedingungen unterschieden werden muß. An *Stephanosphaera* wurde eingehend untersucht, ob unter den Bedingungen, unter denen die Gameten ausgebildet werden, auch immer Kopulationen stattfinden. Es wird gezeigt werden, daß das nicht der Fall ist, daß also die scharfe Trennung berechtigt ist.

I. Die Kolonien wurden in *Volvox*-Lösung kultiviert und 7 Tage nach dem letzten Überimpfen im Dunkeln in destilliertem Wasser von einem $p_H = 7$ zur Gametenbildung gebracht.

Gametenbildung	Kopulationen
im Licht und im Dunkeln in weniger als $^1/_{10}$ *Volvox*-Lösung, in weniger als 0,01 proz. Kolkwitz-Nährlösung, $t = 2—32^0$ C, $p_H = 4{,}7—10{,}3$.	nur im Licht in weniger als $^1/_{10}$ *Volvox*-Lösung, in weniger als 0,01 proz. Kolkwitz-Nährlösung, $t = 8—27^0$ C, $p_H = 5{,}8—8{,}3$.

II. Kultur in *Volvox*-Lösung; in den organischen Substanzen im Dunkeln bei $p_H = 7$ zur Gametenbildung gebracht.

Gametenbildung	Kopulationen
Rohrzucker weniger als 1 Proz., Sorbit weniger als 2 Proz., Glykokoll weniger als 0,1 Proz., im Licht und Dunkeln.	Rohrzucker weniger als 0,01 Proz., Sorbit weniger als 0,01 Proz., Glykokoll keine Kopulation, nur im Licht.

Diese Versuche zeigen eine deutliche Verschiedenheit der Gametenbildungs- und der Kopulationsbedingungen. Die Bedingungen für die Kopulationen sind enger als die für die Gametenbildung. Im Freien werden wohl meist die Gameten nur unter den Kopulationsbedingungen gebildet und bei den meisten Laboratoriumsversuchen

fallen beide Bedingungen zusammen. Aber die Grenzwerte liegen verschieden.

Es hat sich hier gezeigt, wie sehr die Gametenbildung und die Voraussetzung für die Kopulationen von Außenbedingungen abhängig sind, wie bereits Klebs (1896) für zahlreiche Algen und Pilze gefunden hatte, obgleich dessen Versuche in den meisten Fällen, wenn sie heute wiederholt werden, nicht gelingen. Damit ist aber nicht gesagt, daß Klebs' Ergebnisse nicht richtig sind, sondern sein Material, das er meist nicht unter konstanten Bedingungen kultivierte, war gerade derart beschaffen, daß seine Methoden zufällig zum Ziel führten. Es wird sich wahrscheinlich auch herausstellen, daß die Ergebnisse, die hier erhalten worden sind, nicht immer nachzumachen sein werden. Es ist leicht vorstellbar, daß bei anderer Beleuchtung, bei anderer „Luft" usw. die Werte, die hier angegeben sind, sich entsprechend ändern. Es ist heute noch nicht möglich, alle Bedingungen konstant zu halten. Aber das ist auch nicht allzu wichtig. Es soll ja nur gezeigt werden, daß die Bildung der Gameten, daß die Möglichkeit der Kopulationen nur von einigen faßbaren Bedingungen abhängt. Es braucht wohl nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß die rein äußeren Bedingungen irgendwie auf die Zellen einwirken und so im Innern der Zelle „innere" Bedingungen, einen bestimmten „physiologischen Zustand" schaffen, vielleicht auch eine „Kopulationsstimmung" (= Geschlechtszellenbildungsstimmung). Doch sind diese Begriffe nur aus Bequemlichkeitsgründen entstanden, weil man die einwirkenden Bedingungen nicht analysiert hat oder es nicht hat tun können.

Nach Erfahrungen von Prof. Hartmann aus dem Jahre 1903 bildeten die Stephanosphaeren auch einfach bei Nährsalzmangel Gameten. Bei diesem Stamm konnte sogar die erste Kolonie, die aus der Zygote entstand, wieder zur Gametenbildung gebracht werden.

Werden im Dunkeln in destilliertem Wasser entstandene Gameten in *Volvox*-Lösung oder in 0,1 proz. Kolkwitz-Lösung oder in 1 proz. Zuckerlösung usf. gebracht, so finden im Licht keine Kopulationen statt. Jedoch hat bereits Ähnliches Klebs (1896) beobachtet. Werden Gameten von *Chlamydomonas media* in eine höhere Konzentration überführt, so unterbleibt die Kopulation.

Im Kapitel „Geschlechtsstoffe" wird nun gezeigt werden, daß zur Anlockung der Gameten unbedingt Stoffe erforderlich sind und daß diese Stoffe nur innerhalb der Kopulationsbedingungen und nicht innerhalb der Gametenbildungsbedingungen gebildet werden.

5. Restgameten.

In 20 Boveri-Schalen wurden *Stephanosphaera*-Kolonien von Klonkulturen in destilliertem Wasser zur Gametenbildung gebracht. In sämtlichen 20 Schalen fanden Kopulationen statt und wurden Zygoten gebildet. In allen Schalen bleiben aber Gameten übrig, die, als keine Kopulationen mehr stattfanden, miteinander kombiniert wurden. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle 13: 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 19 gehören dem einen Geschlecht an, 2, 3, 6, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20 dem anderen Geschlecht; es herrscht also trotz phänotypischer Geschlechtsbestimmung, trotz Gemischtgeschlechtlichkeit eine deutliche Bipolarität. Aus der Zweigeschlechtlichkeit der Restgameten muß geschlossen werden, daß auch bei Beginn der Kopulationen in einer Schale beide Geschlechter vorhanden sind.

Tabelle 13.

Stephanosphaera pluvialis. Kombination der Restgameten von 20 Schalen. 9 gehören dem einen, 11 dem anderen Geschlecht an.

	1	4	5	7	8	9	11	14	19	2	3	6	10	12	13	15	16	17	18	20
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

6. Gruppenbildung und „Geschlechtsstoffe“.

Über die Erscheinungen der Gruppenbildungen kann gegenüber den Mitteilungen an *Protosiphon* nichts Neues hinzugefügt werden.

Wird zu Filtraten von Restgameten das entgegengesetzte Geschlecht hinzugegeben, so tritt keine Reaktion ein. Werden zu dem

Filtrat Bakterien gegeben, 30 Minuten danach das andere Geschlecht, so erfolgen Gruppenbildungen, aber keine Kopulationen. Dasselbe Geschlecht den Bakterien hinzugefügt ist ohne Wirkung. Ebenso geben unbehandelte Bakterien mit Gameten versetzt keine Reaktion. Erhitzen auf 50° vernichtet die Wirksamkeit des Stoffes. Seine Haltbarkeit betrug nur 6 Stunden. Möglicherweise lag das an den zu geringen Konzentrationen.

Die Stoffe werden nur innerhalb der Kopulationsbedingungen ausgeschieden; also nur im Licht und nur zwischen 8 und 27°. Im Dunkeln werden nach ca. 6 Stunden die vorher belichteten Gameten unwirksam. Bei z. B. 5° und 30° werden keine Stoffe ausgeschieden, trotzdem bei diesen Temperaturen die Gameten gebildet werden und lebhaft umherschwimmen. Die Ausscheidung der Stoffe erfolgt nur bei p_H-Werten zwischen 5,8 und 8,3. In 0,5 proz. Lösung von Rohrzucker, Sorbit, in 0,05 proz. Glykokoll werden, trotz Bildung der Gameten, keine Stoffe ausgeschieden: Es finden daher auch keine Kopulationen statt.

Über die Bildung der Stoffe wurden keine weiteren Versuche ausgeführt wie bei *Chlamydomonas eugametos*, da das Gametenmaterial nicht in großen Mengen zur Verfügung stand.

7. Die Spezifität der „Geschlechtsstoffe".

Für diese Versuche wurden Filtrate beider Geschlechter von *Chlamydomonas eugametos*, *Stephanosphaera pluvialis* und *Protosiphon botryoides* hergestellt. Zu diesen dreimal zwei Filtraten wurden Bakterien zugegeben und 45 Minuten danach reaktionsfähige Gameten beider Geschlechter aller drei Arten. Gruppenbildungen traten bei artgleichem, aber entgegengesetztem Geschlecht auf. Die „Geschlechtsstoffe" der drei untersuchten Arten, der zwei entfernt verwandten Volvocalen, *Chlamydomonas* und *Stephanosphaera*, und der Protococcalen *Protosiphon* sind also spezifisch. Ob sie artspezifisch sind, müßte noch geprüft werden, z. B. mit verschiedenen *Chlamydomonas*-Arten. Dunkelgameten von *Chlamydomonas eugametos* lassen sich durch Filtrate von *Protosiphon*- und *Stephanosphaera*-Gameten beiderlei Geschlechtes nicht kopulationsfähig machen.

Bei der Vermischung z. B. eines +-Filtrates von *Chlamydomonas eugametos* mit +- oder —-Filtraten von *Protosiphon* oder *Stephanosphaera* bleibt die Wirksamkeit des *Chlamydomonas*-Filtrates erhalten. Ein Zusammengeben artfremder Filtrate ändert also nichts an der Wirkung jedes einzelnen Filtrates, während durch Vermischung geschlechtsverschiedener artgleicher Filtrate diese unwirksam werden.

V. Das Sexualitätsproblem.

Die auf Bütschli und Schaudinn zurückgehende Sexualitätshypothese, die von Hartmann ausgebaut worden ist, besagt: „Jede Protisten- und Geschlechtszelle, ja jede Zelle überhaupt ist hermaphrodit oder bisexuell und besitzt die vollständigen Anlagen oder Potenzen des männlichen und weiblichen Geschlechtes. Durch überwiegende Entfaltung der einen oder anderen Potenzen wird eine Zelle männlich oder weiblich in bezug auf andere Zellen, bei denen die entgegengesetzten Potenzen zur Entfaltung kommen. Dadurch bekommen die Zellen eine männliche oder weibliche Tendenz. Eine solche geschlechtliche Tendenz kann sowohl phänotypisch durch Außenfaktoren als auch genotypisch durch besondere geschlechtsbestimmende Gene bewirkt werden" (Hartmann, 1931). Daß Organismen die Potenzen zu der Ausbildung der beiden Arten von Geschlechtszellen besitzen, tritt deutlich bei Formen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung hervor. Es hängt nur von den Umweltbedingungen ab, ob einzelne Zellen männliche oder weibliche bzw. +- oder —-Tendenz erhalten. Bei *Ectocarpus siliculosus*, der bei vermutlich phänotypischer Geschlechtsbestimmung getrenntgeschlechtlich ist und bei dem man aus den bei der Gruppenbildung auftretenden Erscheinungen genau entscheiden kann, ob eine Pflanze männlich oder weiblich ist (Festsetzen der weiblichen Gameten), wurden von Hämmerling aus einer Kultur von männlichen Gameten später männliche und weibliche Pflanzen erhalten. Durch den Nachweis der relativen Sexualität bei *Ectocarpus* (d. h. innerhalb eines Geschlechtes sind Unterschiede in der Stärke des betr. Geschlechtes vorhanden) hat die Sexualitätstheorie eine weitere Sicherung erhalten. Die dritte Voraussetzung der Hartmann'schen Theorie besagt, daß überall, auch dort, wo die kopulierenden Gameten morphologisch völlig gleich sind (isogam), eine sexuelle Differenz zwischen den verschmelzenden Geschlechtskernen bzw. -zellen vorhanden ist. Zumindestens besteht eine physiologische Verschiedenheit zwischen den kopulierenden Gameten. Es sei an *Actinophrys sol* (Belar) und *Ectocarpus siliculosus* erinnert. Da jedoch bisher bei vielen isogamen gemischtgeschlechtlichen Formen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung auch keine physiologischen Unterschiede im Verhalten der Gameten festgestellt werden konnten, sind in letzter Zeit, von diesen Formen ausgehend, Zweifel an der Zweigeschlechtlichkeit geäußert worden (Czurda, Kusano, Mainx, Pascher).

Soeben ist von Kalmus (1932) eine Mitteilung erschienen über den Erhaltungswert der phänotypischen Anisogamie und die Ent-

stehung der ersten Geschlechtsunterschiede. Kalmus geht bei seiner Wahrscheinlichkeitsrechnung aus von primitiven Organismen, von „morphologischer Gleichheit“ und „beliebiger Vertauschbarkeit beim Kopulationsvorgange selbst unabhängig von der Herkunft der Gameten“. Als Beispiele für solche Organismen werden *Hydrodictyon reticulatum* und *Stephanosphaera pluvialis* angeführt. Nun ist aber gerade bei diesen beiden Formen von M. Rosenberg und mir gezeigt worden, daß auch hier zwei Geschlechter und nur zwei vorhanden sind, so daß es sich also erübrigt auf die Arbeit von Kalmus näher einzugehen, da ihr jegliche Grundlagen fehlen.

Durch die Untersuchungen an zwei gemischtgeschlechtlichen Arten mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung *Stephanosphaera pluvialis* und *Protosiphon botryoides*, ist aber gezeigt worden, daß eine klare Bipolarität vorhanden ist, wie durch Kombinationen der Restgameten aus verschiedenen Kulturen festgestellt werden konnte. Durch den Nachweis, daß jedes Geschlecht einen spezifischen Stoff ausscheidet, ist es weiterhin gelungen, physiologische Geschlechtsmerkmale festzustellen. Hierdurch ist ein weiterer Beweis für die Zweigeschlechtlichkeit geliefert worden. Auch bei einer getrenntgeschlechtlichen isogamen Form mit genotypischer Geschlechtsbestimmung, *Chlamydomonas eugametos*, sind physiologische Geschlechtscharaktere („Geschlechtsstoffe“) nachgewiesen worden. Denn bei diesen Arten konnte bisher nur gesagt werden, daß zwar zwei Geschlechter vorhanden sein müssen, die bei der Reduktionsteilung aufgespalten werden; aber bei morphologischer Isogamie konnten die beiden Geschlechter nicht weiter unterschieden werden. Es steht unbedingt fest, daß immer zwei Zellen (bzw. Zellkerne) verschmelzen, die verschiedenen Geschlechtes sind. Das Extrem in der morphologischen Ausbildung der Geschlechtszellen stellen oogame Formen dar. Bei *Chlamydomonas coccifera* z. B. werden nach Goroschankin (1905) ganze vegetative Zellen unbeweglich, die von kleinen männlichen Gameten, welche zu 16 aus einer Zelle hervorgehen, befruchtet werden. Wahrscheinlich werden auch hier „Geschlechtsstoffe“ ausgeschieden. Es wäre zu untersuchen, ob auch die Spermatozoiden Stoffe ausscheiden und ob die Anlockung nur dann zustande kommt, wenn beide, Spermatozoiden und Eier, Stoffe ausscheiden, wie es bei *Arbacia* und *Nereis* der Fall ist (vgl. S. 497). Aber die Ausscheidung dieser Stoffe ist etwas Sekundäres. Das Primäre ist, wie es gerade bei dieser Art hervorgeht, das Vorhandensein (Ausbildung) der beiden Geschlechter (die Bipolarität). Da es nun morphologische Übergänge von Isogamie zur Oogamie gibt, wie z. B. *Chlamydomonas*

Braunii nach Goroschankin (1890) (Macrogameten entstehen zu vier, Microgameten zu acht; 25 : 12 μ), so kann nicht daran gezweifelt werden, daß auch bei morphologisch isogamen Formen zwei Geschlechter vorhanden sind. Wenn Mainx und Pascher dies nicht anerkennen, so müssen sie doch die Feststellung machen, daß immer zwei Zellen verschmelzen, die von zwei verschiedenen Gametensorten stammen. Diese beiden Zellen unterscheiden sich dadurch, daß jede von ihnen einen spezifischen Stoff ausscheidet; und nur wenn sie diese Stoffe produzieren, kopulieren sie miteinander.

In einer soeben erschienenen Arbeit wendet sich Czurda (1932) erneut gegen die allgemeine Sexualitätshypothese von Hartmann und erhebt darin Bedenken gegen den Nachweis von zwei Geschlechtern bei *Protosiphon*, *Stephanosphaera*, *Hydrodictyon* und gegen den Nachweis der geschlechtsspezifischen Stoffe mittels einer „vermutlich schwierigen Methodik". Auch über die Restgameten ist Czurda anderer Ansicht. Er schreibt: „Es ist daher zur Zeit nicht erwiesen, daß die angetroffenen Kopulationspaare nur von Restgameten zweier verschiedener Kulturen gebildet werden." Und zwar nimmt Czurda an, daß Kopulationen nur auftreten, wenn ein bestimmter innerer „physiologischer Zustand" und eine bestimmte Milieubeschaffenheit (u. a. p_H) vorhanden sind. Es erscheint Czurda denkbar, daß die Restgameten deshalb nicht kopuliert haben, weil die zweite Bedingung (p_H) nicht erfüllt gewesen ist und erst nach Vermischen mit den Gameten einer zweiten Kultur die Kopulationstätigkeit wiederaufnehmen können.

Wie bei *Protosiphon* und *Stephanosphaera* (und auch bei *Chlamydomonas*) gezeigt worden ist, finden Kopulationen innerhalb eines sehr breiten p_H-Bereiches (4—9) statt, so daß also bei diesen Formen die sog. zweite Bedingung nicht ein bestimmter p_H-Wert sein kann und daher auch nicht durch Vermischen zweier Kulturen erreicht werden kann. In den Experimenten stammten die *Protosiphon*-Zellen von derselben Agarplatte und wurden in *Volvox*-Lösung mit einem p_H von 7 in verschiedenen Schalen zur Gametenbildung gebracht. In allen fanden Kopulationen statt; der p_H-Wert änderte sich nicht und in allen Schalen blieben Gameten übrig. Die Restgameten verschiedener Schalen wurden kombiniert; es ergab sich bei einem p_H von 7 eine strenge Bipolarität. Wenn man etwas anderes als den p_H-Wert für die zweite Bedingung halten wollte und man Czurda's Ansicht teilen würde, dann müßten in einem Zentrifugat von z. B. +-Restgameten die in dieses gebrachten —-Restgameten anfangen zu kopulieren. Denn das Zentrifugat, das keine Gameten

enthält, unterscheidet sich von der gametenhaltigen Flüssigkeit weder chemisch noch physikalisch. Wie Hunderte von Versuchen gelehrt haben, kopulieren die —-Restgameten niemals in einem Zentrifugat von +-Restgameten und umgekehrt. Damit ist dieser Czurda'sche Einwand eindeutig widerlegt worden. Es handelt sich bei den Restgameten nicht um eine Kopulationshemmung, die durch bestimmte Bedingungen hervorgerufen worden ist, sondern es sind von Anfang an unter den Gameten beide Geschlechter vorhanden, nur nicht in gleicher Menge, so daß also ein Geschlecht übrigbleiben muß: nur auf diese Weise kann man das strenge Zweierschema bei den Kombinationen der Restgameten erklären (vgl. Tab. 13).

Der Nachweis der geschlechtsspezifischen Stoffe läßt sich mit einer so einfachen Methodik erbringen, daß dagegen auch Czurda keine Bedenken haben kann. Selbst wenn man annehmen würde, daß durch die Filtration die Flüssigkeit irgendwie verändert wird, so lassen sich alle hier ausgeführten Versuche in gleicher Weise mit Zentrifugaten von absoluten Reinkulturen erhalten, was auch stets nachgeprüft worden ist; durch das Zentrifugieren kann sich aber die Flüssigkeit nicht ändern und die den Zentrifugaten zugegebenen Bakterien können ihre spezifische Wirksamkeit auf die Gameten des anderen Geschlechts nur durch diese Stoffe erlangen. Ferner geht aus den oben beschriebenen Versuchen deutlich hervor, daß zwei verschiedene Stoffe gebildet werden.

Es muß noch auf einen Begriff eingegangen werden, auf den Czurda sehr großen Wert legt, der sog. „physiologische Zustand". Dieser „physiologische Zustand" einer Kultur ist ein Komplex von Faktoren, der oft schwer zu analysieren ist und bei Organismen von hoher Organisationsstufe recht kompliziert wird. Aber bei primitiven Formen, wie z. B. *Chlamydomonas eugametos*, läßt sich dieser „physiologische Zustand" in seine einzelnen Faktoren zergliedern und es wird gelingen, ihn auch noch bei höheren Formen genau zu analysieren. Dieser „physiologische Zustand" ist nur ein aus Bequemlichkeitsgründen entstandener Begriff, weil unsere Methoden bisher eine Analyse der Bedingungen nicht gestattet haben.

Damit haben sich alle Czurda'schen Einwände als nicht stichhaltig herausgestellt und auch die in Aussicht gestellte Arbeit über Kopulationsbedingungen bei einigen Algen kann an dem Nachweis von zwei Geschlechtern und nur zweien bei *Protosiphon* und *Stephanosphaera* nichts ändern, ebensowenig bei *Hydrodictyon*. Zur Kopulation sind bestimmte Bedingungen notwendig, ebenso wie zur Ausbildung der Gameten. Und wenn die Kopulationsbedingungen her-

gestellt sind, dann können Kopulationen der Gameten stattfinden. Aber es erfolgen nur Kopulationen, wenn zwei Sorten von Geschlechtszellen vorhanden sind. Es ist anzunehmen, daß auch bei Zygnemalen, die Czurda besonders zur Unterstützung seiner Anschauungen heranzieht, zwei geschlechtsspezifische Stoffe nachzuweisen sein werden, besonders leicht bei den getrenntgeschlechtlichen Formen mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung. Czurda könnte den Beweis für seine Behauptung nur dadurch erbringen, wenn es ihm gelänge, die Restgameten einer Kultur wieder zur Kopulation zu bringen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Berlin begonnen und nach dem Tode von Prof. Dr. H. Kniep am Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, fortgesetzt und beendet. Herr Prof. Dr. Hans Kniep wird mir für seine Anregungen in dankbarer Erinnerung bleiben. Herrn Prof. Dr. Max Hartmann, unter dessen Leitung der größte Teil dieser Untersuchungen ausgeführt wurde, möchte ich an dieser Stelle für seine rege Anteilnahme meinen herzlichen Dank aussprechen. Herrn Prof. Dr. J. Schwemmle, Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Th. Czaja und Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Brieger danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit während der Tätigkeit am Pflanzenphysiologischen Institut. Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Hämmerling, Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, bin ich für seine freundliche Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

1. *Chlamydomonas eugametos* ist eine getrenntgeschlechtliche (heterözische) Alge mit genotypischer Geschlechtsbestimmung. Unter den Bedingungen, in denen die Zellen beweglich sind (und sich durch Teilung vermehren), sind sie im Licht Gameten.

Die Größe und die Dauer der von den Gameten gebildeten Gruppen ist abhängig von den Zellmengen, die miteinander kombiniert werden.

Gruppenbildung des einen Geschlechtes in Filtraten des anderen Geschlechtes ist nur möglich, wenn den Filtraten Bakterien beigegeben werden. Die hierbei wirksamen geschlechtsspezifischen Stoffe werden nur im Licht gebildet. Man kann indifferente Dunkelgameten durch Behandlung mit einem wirksamen Filtrat des gleichen Geschlechtes kopulationsfähig machen.

Damit sind für eine morphologisch isogame Form physiologische Geschlechtscharaktere („Geschlechtsstoffe“) nachgewiesen worden.

2. *Protosiphon botryoides* ist eine gemischtgeschlechtliche (synözische) Protococcale mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung.

Die in den einzelnen Schalen übrigbleibenden Restgameten gehören in einer Schale immer nur einem Geschlecht an. Bei Kombinationen der Restgameten verschiedener Schalen treten wieder Kopulationen auf: Es ergibt sich eine strenge Bipolarität. Dasselbe gilt auch für die Restgameten von Einzelzellen.

Auch bei dieser Art konnten physiologische Geschlechtsmerkmale („Geschlechtsstoffe") nachgewiesen werden.

3. *Stephanosphaera pluvialis* ist eine synözische Volvocale mit phänotypischer Geschlechtsbestimmung.

Es ist gezeigt worden, daß Gametenbildungsbedingungen und Kopulationsbedingungen streng voneinander getrennt werden müssen. Bei Bedingungen, unter denen Gameten gebildet werden, finden nicht immer Kopulationen statt. Die Kopulationsbedingungen sind spezieller.

Die Kombinationen von Restgameten ergeben eine deutliche Zweigeschlechtlichkeit. Auch hier sind zwei „Geschlechtsstoffe" vorhanden. Damit sind die Erklärungsversuche von Mainx und Pascher widerlegt worden. Es sind also bei allen bisher genau analysierten Fällen stets zwei Geschlechter und nur zwei nachgewiesen worden.

Literaturverzeichnis.

Berthold, G. (1881): Die geschlechtliche Fortpflanzung der eigentlichen Phaeosporeen. Mitt. a. d. Zool. Stat. Neapel. Bd. 2.

Burgeff, H. (1924): Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. I. Bot. Abh. Bd. 4.

Carter, N. (1926): An investigation into the cytology of the Ulvaceae. Ann. of Bot. Bd. 40.

Cohn, F. (1853): Über eine neue Gattung aus der Familie der Volvocineen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 4.

Cohn, F. u. Wichura, M. (1857): Über Stephanosphaera pluvialis. Nov. Act. Acad. Caes. L. — C. Nat. Curios Vol. 26.

Czurda, V. (1930): Experimentelle Untersuchungen über die Sexualitätsverhältnisse der Zygnemalen. Beih. z. bot. Zentralbl. I. Abt. Bd. 47.

— (1931): Zur Morphologie und Systematik der Zygnemalen. Ibid. II. Abt. Bd. 48.

— (1932): Über einige Grundbegriffe der Sexualitätstheorie. Ibid. I. Abt. Bd. 50.

Föyn, B. (1929): Untersuchungen über die Sexualität und Entwicklung von Algen. IV. Vorläufige Mitteilung über die Sexualität und den Generationswechsel von Cladophora und Ulva. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 47.

Geitler, L. (1931): Untersuchungen über das sexuelle Verhalten von Tetraspora lubrica. Biol. Zentralbl. Bd. 51.

Hartmann, M. (1904): Die Fortpflanzungsweisen der Organismen, Neubenennung und Einteilung derselben, erläutert an Protozoen, Volvocineen und Dicyemiden. Biol. Zentralbl. Bd. 24.

— (1914): Der Generationswechsel der Protisten und sein Zusammenhang mit dem Reduktions- und Befruchtungsproblem. Verh. d. deutsch. zool. Ges. Bd. 24.

— (1925): Untersuchungen über relative Sexualität. Biol. Zentralbl. Bd. 45.

— (1927): Allgemeine Biologie. Jena.

— (1929): Untersuchungen über die Sexualität und Entwicklung von Algen. III. Über die Sexualität und den Generationswechsel von Chaetomorpha und Enteromorpha. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 47.

— (1929): Fortpflanzung und Befruchtung als Grundlage der Vererbung. Handb. d. Vererbungswiss. I.

— (1929): Verteilung, Bestimmung und Vererbung des Geschlechtes bei den Protisten und Thallophyten. Ibid. II.

— (1931): Relative Sexualität und ihre Bedeutung für eine allgemeine Sexualitäts- und eine allgemeine Befruchtungstheorie. Naturwiss. Bd. 19.

— (1932): Neue Ergebnisse zum Befruchtungs- und Sexualitätsproblem. (Nach Untersuchungen von M. Hartmann, J. Hämmerling und F. Moewus.) Ibid. Bd. 20.

Hieronymus, G. (1887): Über Stephanosphaera pluvialis. Beitr. z. Biol. d. Pflanze Bd. 4.

Jollos, V. (1926): Untersuchungen über die Sexualitätsverhältnisse von Dasycladus clavaeformis. Biol. Zentralbl. Bd. 46.

Just, E. E. (1930): The present status of the fertilizin theory of fertilization. (Sammelreferat.) Protoplasma Bd. 10.

Kalmus, H. (1932): Über den Erhaltungswert der phänotypischen (morphologischen) Anisogamie und die Entstehung der ersten Geschlechtsunterschiede. Biol. Zentralbl. Bd. 52.

Klebs, G. (1892): Zur Physiologie der Fortpflanzung von Vaucheria sessilis. Verhandl. d. Naturf. Ges. Basel. Bd. 10.

— (1896): Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena.

Kniep, H. (1928): Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena.

Köhler, E. (1930): Beobachtungen an Zoosporenaufschwemmungen von Synchytrium endobioticum. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 82.

Korschikoff, A. A. (1926): Algologische Notizen. II. Russ. Arch. f. Protistenk. Bd. 5.

— (1927): Phyllocardium complanatum, a new Polyblepharidacea. Arch. f. Protistenk. Bd. 58.

Kusano, S. (1930): The Life-History and Physiology of Synchytrium fulgens, with special reference to its Sexuality. Jap. Journ. Bot. Vol. 5.

Mainx, F. (1931): Physiologische und genetische Untersuchungen an Oedogonien Zeitschr. f. Bot. Bd. 24.

— (1931): Gametenkopulation und Zygotenkeimung bei Hydrodictyon reticulatum. Arch. f. Protistenk. Bd. 75.

Moewus, F. (1931): Neue Chlamydomonaden. Arch. f. Protistenk. Bd. 75.

— (1932): Volvocales-Literaturverzeichnis. Beih. z. bot. Zentralbl. I. Abt. Bd. 49.

Moewus, F. (1933): Untersuchungen über die Variabilität von Chlamydomonaden. Arch. f. Protistenk. Bd. 80.

Oltmanns, F. (1897): Über Scheinkopulationen bei Ectocarpus und anderen Algen. Flora Bd. 83.

— (1899): Über die Sexualität der Ectocarpeen. Ibid. Bd. 85.

Pascher, A. (1916): Über die Kreuzung einzelliger, haploider Organismen: Chlamydomonas. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 34.

— (1927): Süßwasserflora. Heft 4.

— (1931): Über Gruppenbildung und „Geschlechtswechsel" bei den Gameten einer Chlamydomonadine (Chlamydomonas paupera). Jahrb. wiss. Bot. Bd. 75.

Ronsdorf, L. (1931): Über die chemischen Bedingungen von Wachstum und Zygotenbildung bei Phycomyces Blakesleeanus. Planta Bd. 14.

Rosenberg, M. (1930): Die geschlechtliche Fortpflanzung von Botrydium granulatum. Österr. bot. Zeitschr. Bd. 79.

Schreiber, E. (1925): Zur Kenntnis der Physiologie und Sexualität höherer Volvocales. Zeitschr. f. Bot. Bd. 17.

Schulze, B. (1927): Zur Kenntnis einiger Volvocales. Arch. f. Protistenk. Bd. 58

Strehlow, K. (1929): Über die Sexualität einiger Volvocales. Zeitschr. f. Bot Bd. 21.

Zimmermann, W. (1921): Zur Entwicklungsgeschichte und Cytologie von Volvox. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 60.

Lebenslauf.

Am 7. Dezember 1908 wurde ich, Franz Moewus, als Sohn des Schneidermeisters Julius Moewus in Berlin-Spandau geboren. Ich besuchte von 1915 ab die städtische Oberrealschule zu Berlin-Spandau, an der ich Ostern 1927 die Reifeprüfung ablegte. Danach bezog ich die Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin, an der ich acht Semester immatrikuliert war. Nach dem Tode von Prof. Hans Kniep, in dessen Institut die algologischen Untersuchungen begonnen wurden, setzte ich meine Studien am Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Abteilung M. Hartmann, fort.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Privatdozenten: A. Th. Czaja, L. Diels, M. Hartmann, R. Hesse, H. Kniep, P. Metzner, K. Noack.

Lippert & Co. G.m.b.H., Naumburg (Saale)
Printed in Germany